BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

COORDENADORES:
WALTER BORZANI
WILLIBALDO SCHMIDELL
URGEL DE ALMEIDA LIMA
EUGÊNIO AQUARONE

VOLUME I

FUNDAMENTOS

EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA

Coordenadores:
WALTER BORZANI
WILLIBALDO SCHMIDELL
URGEL DE ALMEIDA LIMA
EUGÊNIO AQUARONE

BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

VOLUME I

FUNDAMENTOS

EDITORA BLUCHER 50 anos

www.blucher.com.br

2ª reimpressão – 2008

EDITORA BLUCHER
Rua Pedroso Alvarenga, 1245 – 4º andar
04531-012 – São Paulo, SP – Brasil
Fax: (11) 3079-2707
Tel.: (11) 3078-5366
e-mail: editora@blucher.com.br
site: www.blucher.com.br

ISBN 978-85-212-0278-3

FICHA CATALOGRÁFICA

Borzani, Walter
Biotecnologia industrial / Walter Borzani - outros coordenadores: Willibaldo Schmidell, Urgel de Almeida Lima, Eugênio Aquarone -- São Paulo: Blucher, 2001.

Bibliografia.
ISBN 978-85-212-0278-3

1. Biotecnologia 2. Biotecnologia industrial 3. Microbiologia industrial 4. Microorganismos biotecnológicos I. Borzani, Walter II. Schmidell, Willibaldo III. Lima, Urgel de Almeida IV. Aquarone, Eugênio

05-0906 CDD-606.6

Índices para catálogo sistemático:
1. Biotecnologia Industrial: Engenharia química 606.6

APRESENTAÇÃO

Este conjunto de quatro volumes, reunidos sob o título amplo de BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL, é o resultado do trabalho de um grupo de profissionais com vistas à atualização da coleção BIOTECNOLOGIA, cuja publicação foi iniciada em 1975 e terminada em 1983.

A experiência acumulada e as muitas mudanças ocorridas nestes últimos vinte anos, ao lado da indiscutível e crescente importância das aplicações da BIOTECNOLOGIA em diversos setores de produção de bens e serviços, justificam plenamente — assim pensam os Coordenadores e o Editor desta nova Coleção — esta primeira atualização, principalmente pelo fato de se destinar ao ensino em cursos de graduação.

Nosso primeiro objetivo, nesta Apresentação, é tomar conhecimento do que, hoje, se entende por BIOTECNOLOGIA, e do que vem a ser BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL.

A demarcação nítida do campo de atuação de qualquer ramo do conhecimento é sempre tarefa muito difícil, para não dizer impossível.

Tanto isto é verdade que, com certa freqüência, tratados relativos a um dado setor do conhecimento atacam diretamente o exame de uma série de temas sem tentar esboçar, preliminarmente, um quadro que, em largos traços, indique os objetivos e as aplicações do que vai ser estudado.

Tal maneira de agir, principalmente em cursos de graduação, não nos parece aconselhável. Julgamos importante, no início dos estudos, a apresentação de um panorama que dê, aos alunos, uma idéia, ainda que não bem definida, daqueles objetivos e aplicações.

Não nos parece que seja imprescindível transcrever, aqui, todas as propostas de "definição" do que se deva entender por Biotecnologia. Algumas delas serão suficientes para que seja possível alcançar nosso objetivo.

Iniciaremos com a proposta que o Prof. Antonio Paes de Carvalho, em seu trabalho intitulado "Patentes para a Biotecnologia", apresentou, em dezembro de 1993, em reunião realizada na Academia Brasileira de Ciências:

"Entende-se por Biotecnologia o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços".

O Office of Technology Assessment, por sua vez, "definiu" Biotecnologia como sendo:

"O conjunto de processos industriais que englobam processos biológicos".

Por outro lado, a Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée, conceituou Biotecnologia como:

"Aplicação da Bioquímica, da Biologia, da Microbiologia e da Engenharia Química aos processos e produtos industriais (incluindo os produtos relativos à saúde, energia e agricultura) e ao meio ambiente".

Finalmente, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em seu Programa Nacional de Biotecnologia, "definiu" Biotecnologia nos seguintes termos:

"A utilização de sistemas celulares para obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais".

As poucas tentativas de definição aqui transcritas mostram, nitidamente, que a Biotecnologia tem por base vários ramos do conhecimento que poderiam ser classificados de FUNDAMENTAIS (como, por exemplo, Bioquímica, Fisiologia, Genética, Microbiologia, Virologia, Botânica, Zoologia, Ecologia) ao lado de outros que poderiam ser agrupados sob a denominação genérica de ENGENHARIAS (principalmente a Engenharia Química).

Trata-se, portanto, de um campo de trabalho tipicamente multidisciplinar, o que torna absolutamente imprescindível a efetiva colaboração de profissionais atuantes em diferentes setores do conhecimento.

Destaque-se, porém, que essa atividade multidisciplinar não deve ser entendida como resultante de uma simples justaposição de profissionais, cada um deles com sua formação especializada e preocupado apenas com sua área específica. Importa que seja, de fato, um trabalho de vários profissionais efetivamente integrados, de modo que cada um deles tenha conhecimento, obviamente não aprofundado, dos princípios e das técnicas dos campos de atuação dos demais. Assim, apenas para citar um exemplo, caso um microbiologista participe de um grupo que estuda a otimização de um dado processo, é desejável que tenha alguns conhecimentos, mesmo que superficiais, a respeito das estratégias empregadas para a modelagem matemática. Vice-versa, o especialista em modelagem deve efetuar um esforço adicional para compreender as características do sistema microbiano em estudo, a fim de incorporá-las ao modelo. Somente desta forma a atividade multidisciplinar efetivamente existirá e poderá ser mais eficiente.

Se é verdade, por um lado, que a Biotecnologia só passou a ser considerada altamente prioritária há relativamente pouco tempo, também é verdade, por outro, que processos biotecnológicos vêm sendo utilizados na produção de vários bens, principalmente alimentos, desde a mais remota antigüidade. Basta, neste particular, fazer referência ao preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais na Babilônia e no Egito (8.000 a 6.000 anos a.C.), à produção de pão, utilizando fermentos, no Egito (4.000 anos a.C.) e à produção de vinhos na Grécia (2.000 a.C.).

A Biotecnologia encontra muitas aplicações importantes nas seguintes áreas de atividade:

- Agricultura
- Pecuária
- Saúde
- Preservação do meio ambiente
- Indústria

Suas aplicações na indústria constituem o objetivo primordial da Biotecnologia Industrial. A Fig. 1, adaptada de um artigo publicado pelo Prof. Rainer Jonas, é uma boa representação gráfica da "localização" da Biotecnologia Industrial e de sua interação com outros ramos do conhecimento.

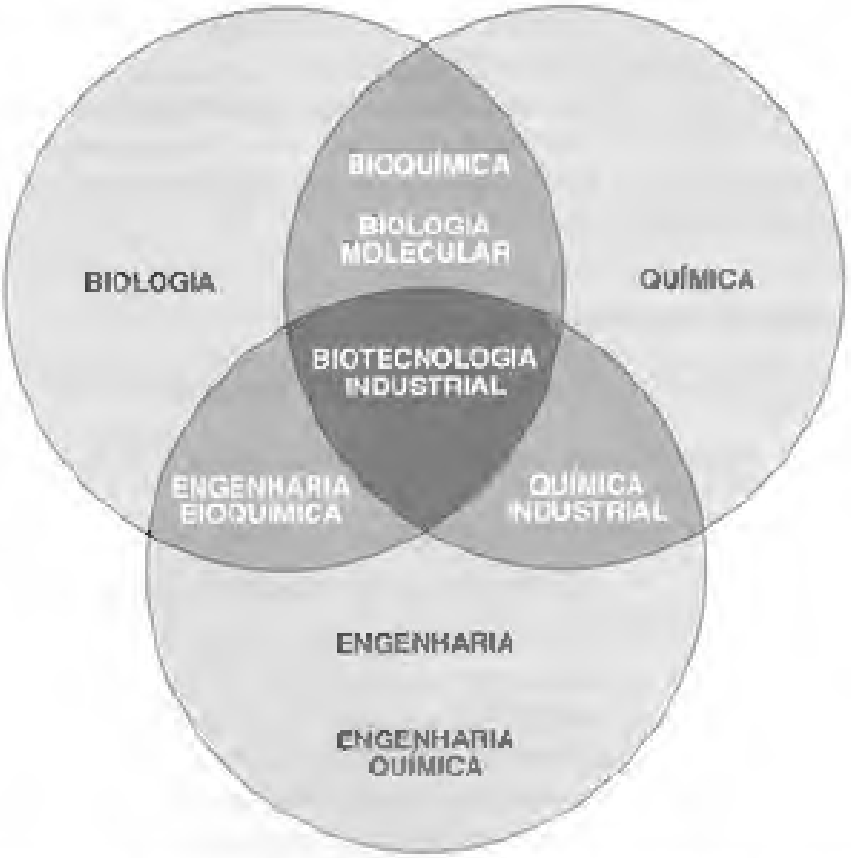


Figura 1 — Representação esquemática da interação da Biotecnologia Industrial com outros ramos do conhecimento.

Convém, finalmente, ressaltar que, como ocorre em outros campos de trabalho, as áreas de aplicação da Biotecnologia, anteriormente apontadas, não são "gavetas" estanques. Há entre elas, freqüentemente, fortes interações. Apenas para citar um exemplo, considere-se o caso de uma dada vacina, desenvolvida na área da Saúde. Na etapa final de produção dessa vacina em larga escala surgirão, muito provavelmente, problemas de cunho tecnológico e de engenharia que poderão tornar imprescindível a efetiva participação da Biotecnologia Industrial na busca das soluções mais adequadas.

A presente Coleção consta de quatro volumes. No primeiro — FUNDAMENTOS — reúnem-se, como o próprio nome claramente indica, temas fundamentais indispensáveis ao estudo de processos biotecnológicos. O segundo — ENGENHARIA BIOQUÍMICA — focaliza os principais problemas de engenharia envolvidos naqueles processos, ao lado de assuntos correlatos de âmbito mais geral, mas importantes na produção em larga escala. Os dois últimos volumes — PROCESSOS FERMENTATIVOS E ENZIMÁTICOS e BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS — foram dedicados à descrição e discussão de processos biotecnológicos de importância industrial.

Todos os temas foram tratados partindo-se do pressuposto de que a obra se destina, primordialmente, a cursos de graduação. A bibliografia indicada no final de cada capítulo poderá servir como ponto de partida para os que pretenderem um exame mais aprofundado de um ou outro tópico.

Os Coordenadores, o Editor e, seguramente, também os Autores, agradecem todas as sugestões relativas à estrutura da Coleção ou de qualquer de suas partes, bem como a identificação de falhas ou incorreções, infelizmente sempre possíveis, que lhes sejam encaminhadas pelo leitor.

Literatura Recomendada

1) Ancíles, W. & Cassiolato, J.E. **Biotecnologia: seus impactos no setor industrial**. CNPq, Brasília, 1985.

2) Hachn, H. **Bioquimica de las fermentaciones**. Aguilar S.A. de Ediciones, Madri, 1956.

3) Jonas, R. **GBF - Scientific Annual Report** (pp. 35-46). Alemanha, 1990.

4) Paes de Carvalho, A. **Patentes para a Biotecnologia**. Apresentado à Academia Brasileira de Ciências em 6.12.1993.

PREFÁCIO

Cuando la colección "Biotecnologia", editada por los profesores Eugénio Aquarone, Walter Borzani y Urgel de Almeida Lima, apareció en 1975, causó un hondo impacto entre los biotecnólogos latinoamericanos. Se trató de la primera obra sobre el tema escrita y publicada en nuestra región y representó una contribución especialmente valiosa al estudio y enseñanza de esa pujante disciplina.

"Biotecnologia" constó originalmente de tres volúmenes: *Tecnologia das Fermentações, Tópicos de Microbiologia Industrial* y *Engenharia Bioquímica*, a los cuales se sumó en 1981 *Corrosão Microbiológica* y luego *Alimentos e Bebidas produzidos por Fermentação* en 1983. Ahora, pasados ya más de veinte años, los mismos editores, com la participación del profesor Willibaldo Schmidell, nos brindam la oportunidad de apreciar y disfrutar la nueva colección "Biotecnologia Industrial" como una sucesora natural de "Biotecnologia". El contenido de la nueva obra há sido totalmente renovado y actualizado en concordancia com los notables avances experimentados por el conocimiento en esta área en las últimas décadas, incluyendo las modernas técnicas de la ingeniería genética y el uso de microorganismos recombinantes en bioprocesos.

La nueva colección está dividida en cuatro volúmenes que abarcan los mas variados tópicos relacionados com la biotecnología industrial: *Fundamentos, Ingeniería Bioquímica, Procesos Fermentativos y Enzimáticos* y *Biotecnología en la Producción de Alimentos*. En total son 74 capítulos escritos por distinguidos especialistas brasileros, conteniendo información actualizada acerca tanto de los aspectos básicos como de los aplicados de la utilización de células microbianas y no microbianas para finalidades productivas.

El Volumen 1, *Fundamentos*, entrega un completo panorama del estado del conocimiento en microbiología, genética, bioquímica y enzimología, finalizando com un panorama de las aplicaciones industriales de la biotecnología, abriendo así el camino a los próximos volúmenes. En el Volumen 2, *Ingeniería Bioquímica*, se exponen los principales aspectos relacionados com la cuantificación de los procesos microbianos y enzimáticos y el diseño y operación de los equipos de proceso requeridos en una instalación industrial. El Volumen 3, *Procesos Fermentativos y Enzimáticos*, presenta y discute la aplicación de los microorganismos a la producción de una amplia gama de metabolitos y enzimas de interés práctico, el uso de enzimas como biocatalizadores industriales y la aplicación de los procesos microbianos a diversos sectores industriales y a la descontaminación de efluentes líquidos y residuos sólidos. Finalmente, el Volumen 4, *Biotecnología en la Producción de Alimentos*,

detalla la aplicación de la biotecnología a una amplia variedad de industrias de ese importante sector.

Por su estructura y contenido, y por la indiscutible autoridad de sus editores y autores, estoy cierto que Biotecnología Industrial está destinada a constituirse en una obra insustituíble para la enseñanza universitaria de pre y post-grado, así como también en una valiosa fuente de consulta para el biotecnólogo en la industria.

Fernando Acevedo
Profesor
Escuela de Ingeniería Bioquímica
Universidad Católica de Valparaíso
Valparaíso, Chile

AUTORES

Ana Clara Guerrini Schenberg
Professora Doutora
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Bayardo Baptista Torres
Professor Doutor
Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Av. Prof. Lineu Prestes, 748
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Flávio Allerthum
Professor Titular
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

João Lúcio de Azevedo
Professor Titular
Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Luiz Carlos Basso
Professor Doutor
Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Luiz Eduardo Gutierrez
Professor Titular
Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Maria Ligia C. Carvalhal
Professora Doutora
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Otto Jesu Crocomo
Professor Titular
Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Walter Borzani
Professor Pleno
Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia
Escola de Engenharia Mauá
Departamento de Engenharia Química e de Alimentos
Praça Mauá, 1
09580-900, São Caetano do Sul, SP, Brasil

CONTEÚDO

CONTEÚDO
VOLUME 2

CONTEÚDO

VOLUME 2

CONTEÚDO

VOLUME 2

1 ELEMENTOS DE MICROBIOLOGIA

Flávio Alterthum

1.1 Introdução à Microbiologia

A partir da descoberta e início dos estudos dos microrganismos, ficou claro que a divisão dos seres vivos em dois reinos, animais e plantas, era insuficiente. O zoólogo E.H. Haeckel em 1866 sugeriu a criação de um terceiro reino, denominado Protista, englobando as bactérias, algas, fungos e protozoários. Essa classificação mostrou-se satisfatória até que estudos mais avançados sobre a estrutura celular demonstraram duas categorias de células: as procarióticas e as eucarióticas. Nas eucarióticas o núcleo é envolto pela membrana nuclear e apresenta no seu interior vários cromossomas. Assim, em 1969, R.H. Whittaker propôs a expansão da classificação proposta por Haeckel, baseado não só na organização celular, mas também na forma de obter energia e alimento: Reino Plantae, Reino Animalia, Reino Fungi, Reino Protista (inclui algas e protozoários) e Reino Monera (bactérias e cianobactérias) (Fig. 1.1).

Estudando as similaridades e diferenças do RNA ribossômico, C. Woese propôs, em 1979, uma nova classificação para os seres vivos: Domínio ou Supra-reino Arqueobactérias, incluindo bactérias metanogênicas, bactérias termófilas, bactérias acidofílicas e bactérias halófilas; Domínio ou Supra-reino Eubacteria, incluindo as demais bactérias e cianobactérias; e Domínio ou Supra-reino Eucariota, incluindo plantas, animais, fungos, protozoários e algas (Fig. 1.2).

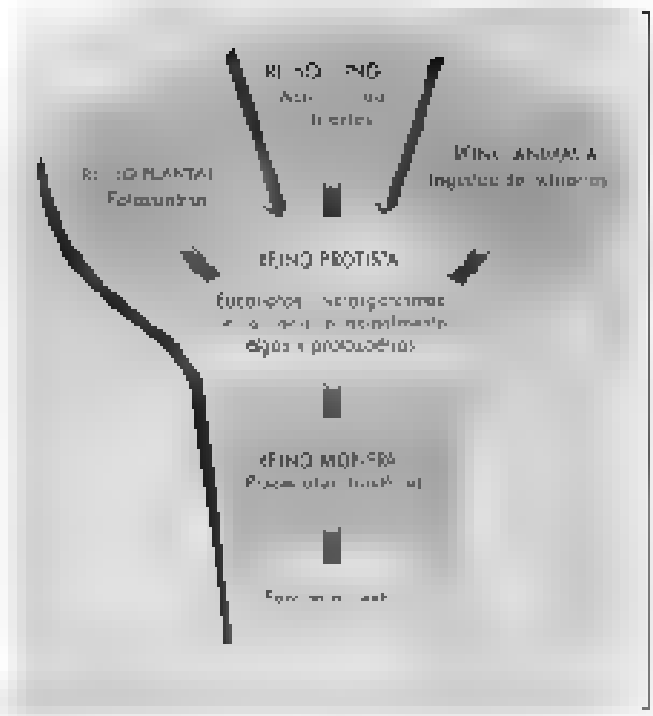


Figura 1.1 Distribuição dos organismos vivos em três domínios de acordo com a proposta de Carl R. Woese. Observe que a maior diversidade de organismos está no domínio Eucarioto. (Fonte: Brock Biology of Microorganisms, 8ª edição, de Madigan, Martinko e Parker, 2000.)

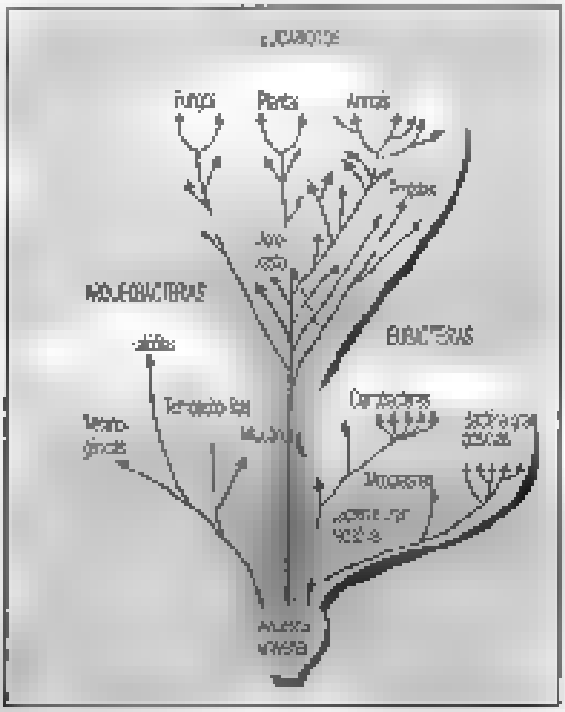


Figura 1.2 Três grandes ramos em que se dividem os seres vivos de acordo com a proposta de Carl R. Woese.

Por não apresentarem uma estrutura celular, os vírus não são considerados seres vivos e portanto não se enquadram nas classificações acima. São formados basicamente por uma porção de material genético, DNA ou RNA, e uma cápsula de substâncias envolvidos por proteína. Alguns vírus com estrutura mais complexa, tem sobreposto a camada proteica um envoltório lipoproteíco. Os vírus, quando fora das células não possuem atividade metabólica própria e portanto não sintetizam protoplasma nem crescem. São sintetizadas peças que as dispersam, as quais penetram, pois assumem o comando do metabolismo. O aumento do número de vírus não ocorre pelo processo de divisão como nos organismos celulares, mas sim pela replicação viral.

Tabela 1 Diferenças morfológicas e fisiológicas entre procariontes e eucariontes

CARACTERÍSTICA	PROCARIÓTICAS	EUCARIÓTICAS
Membrana nuclear	Ausente	Presente
Nucléolo	Ausente	Presente
Número de cromossomas	Um	Mais que um
Retículo endoplasmático	Ausente	Presente
Aparelho de Golgi	Ausente	Presente
Mitocondrias	Ausente	Presente
Lisossomas	Ausente	Presente
Histonas associadas ao cromossoma	Ausente	Presente
Ribossomas	70S	80S
Cloroplastos	Ausente	Presente em plantas
Parede celular com mucopolissacarídeo	Presente	Ausente
Transporte de elétrons	Membrana	Mitocôndrias
Fagocitose	Ausente	Às vezes presente
Pinocitose	Ausente	Às vezes presente

* Há exceções

Os vírus são classificados de acordo com o ácido nucléico, composição química e morfologia. Embora sejam objetos de estudo da microbiologia, não serão abordados neste capítulo pelo redator.

O sistema formal de organização, classificação e nomenclatura dos seres vivos é chamado de taxonomia. A organização está baseada em sete níveis descendentes, sendo o reino o mais amplo e maior e a espécie o mais específico e menor. Os demais níveis são, em ordem decrescente de tamanho, classe, ordem, família e gênero.

A classificação é o arranjo dos organismos em grupos, de preferência obedecendo às relações evolutivas. A nomenclatura é o processo de dar nomes às espécies existentes. É binomial, sendo o nome científico uma combinação do nome genérico (gênero) seguido da espécie. O nome do gênero é iniciado com letra maiúscula, mas o da espécie não, e ambos os nomes são escritos em itálico ou grifado. Exemplos:

Saccharomyces cerevisiae	Escherichia coli
gênero espécie	gênero espécie
Saccharomyces cerevisiae	*Escherichia coli*

O microscópio foi e ainda é, em muitos casos, o equipamento laboratorial mais utilizado no estudo dos microrganismos. Há duas categorias principais de microscópios empregados: óptico e eletrônico. Eles diferem na forma pela qual se dá a ampliação e visualização do objeto. Na microscopia óptica um sistema de lentes manipula um feixe de luz que atravessa o objeto e chega ao olho do observador; na microscopia eletrônica a luz é substituída por um feixe de elétrons, e as lentes por um sistema de campo magnético. A microscopia óptica comum aumenta até 2 000 vezes e tem variações como a microscopia de fase, de campo escuro e de fluorescência. A microscopia eletrônica permite um aumento de cerca de 400 000 vezes e apresenta variações como a de transmissão e a de varredura.

A Fig. 1.3 apresenta alguns exemplos comparativos de tamanho de microrganismos, vírus e a cabeça de equivalência das unidades empregadas na microbiologia.

Neste capítulo abordaremos somente aspectos gerais relativos a bactérias e fungos.

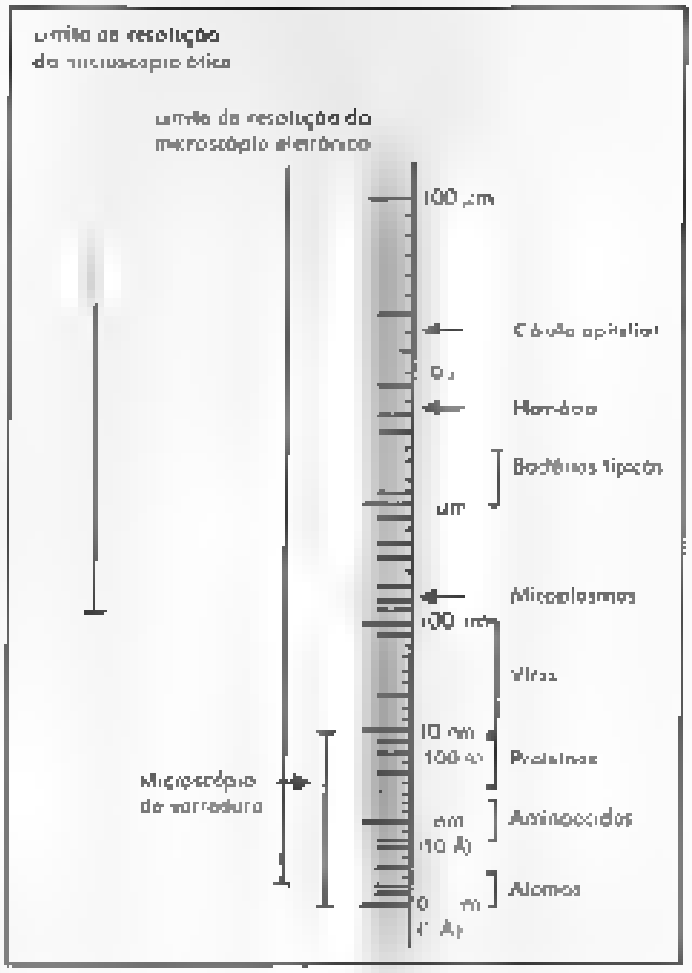


Figura 1.3 — Limites de resolução dos microscópios e possibilidades de visualização de células, bactérias, vírus, moléculas e átomos.

1.2 – Morfologia e estrutura

1.2.1 Bactérias

Quando observadas ao microscópio, a maior parte das bactérias apresenta-se em uma das três formas: esféricas, cilíndricas ou espiraladas. As bactérias de forma esférica denominam-se cocos e as cilíndricas, bacilos. Nas espiraladas, quando o corpo é rígido e apresenta várias espiras, recebem o nome de espirilos e quando o corpo é flexível, podem ter forma de vírgula ou uma única espira, recebem a designação de vibriões (Fig. 1.4).

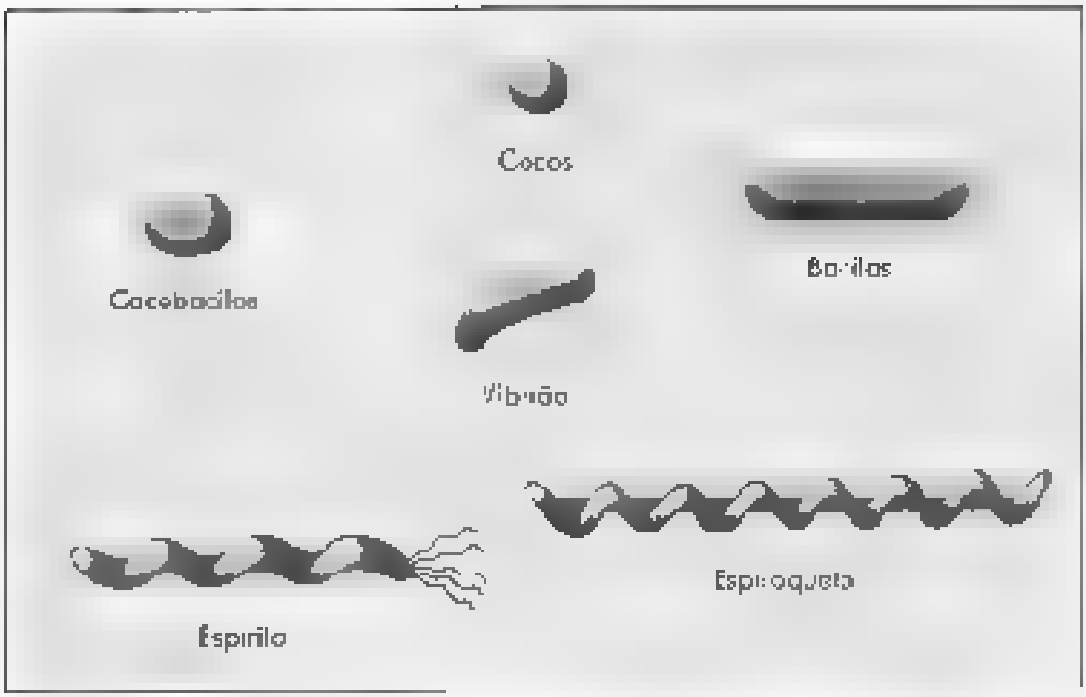


Figura 1.4 Principais formas das bactérias

Os cocos, ao se dividirem, podem dar origem a agrupamentos característicos. Se agrupados em pares, são chamados de diplococos; em cadeias, são chamados estreptococos; e em cachos, estafilococos. Os cocos que permanecem isolados são chamados de micrococos (Fig. 1.5).

Os bacilos que ao se dividirem permanecem em cadeias são chamados de estreptobacilos.

A morfologia individual e os agrupamentos podem ser melhor observados após as bactérias apresentarem-se coradas. O método mais usual de coloração é o de Gram, que permite a divisão em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas.

Caracteristicamente, as células bacterianas são pequenas. O diâmetro das esferas varia de 0,5 a 4,0 µm e o comprimento dos cilindros raramente ultrapassa 15 µm. Recentemente foi descoberta uma bactéria macroscópica (0,5 mm de comprimento), habitando o intestino de peixes que vivem a centenas de metros de profundidade nos oceanos.

Quanto à estrutura, a célula bacteriana apresenta as características dos seres procarióticos (Fig. 1.6).

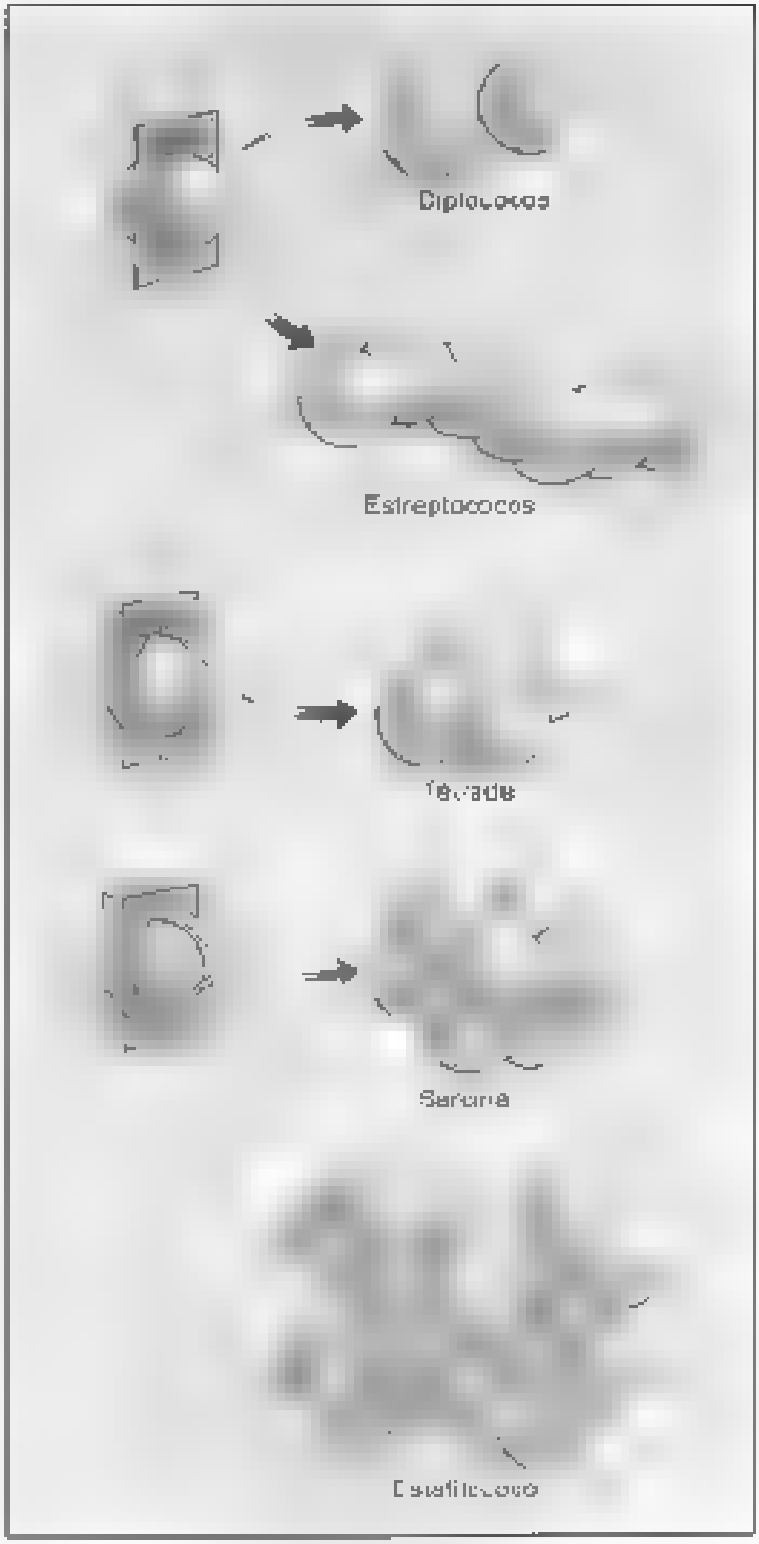


Figura 5

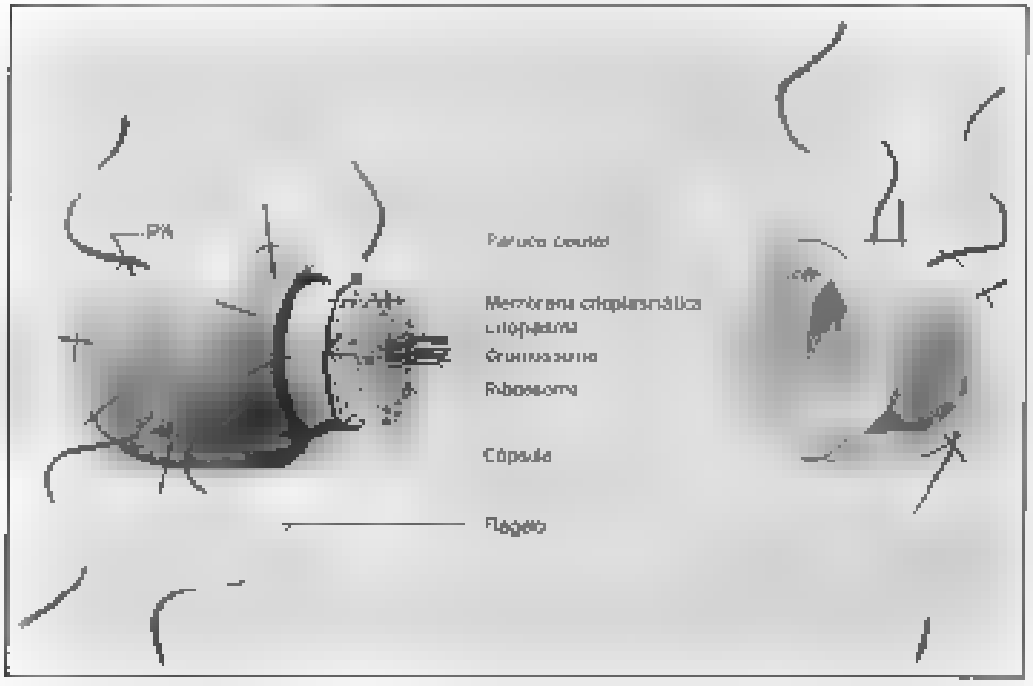


Figura 1.6 Representação esquemática de uma célula procariótica bacteriana e suas principais estruturas (figura adaptada de [illegible] 1993).

A célula é delimitada pela *membrana citoplasmática*, de composição lipoprotéica e de importância vital. Além de regular as trocas com o meio ambiente, a membrana executa várias funções que, nas células eucarióticas, dependem de estruturas específicas: processos respiratórios (mitocôndrias), fotossíntese (cloroplastos), sustentação de ribossomos, retículo, orientação da divisão nuclear, [illegible] e biossíntese de estruturas de superfície.

Externamente à membrana, as bactérias possuem uma *parede celular* rígida, que garante a forma da célula e a protege contra a diferença de pressão osmótica entre o meio interno e o ambiente (a pressão dentro da célula pode ser vinte vezes maior do que fora). A parede é constituída de um arcabouço básico, denominado mucopeptídeo ou peptídeoglicano, formado de cadeias de polissacarídeos (unidades alternantes de N-acetilglicosamina e de ácido N-acetilmurâmico) unidas entre si por meio de cadeias peptídicas. A esse arcabouço podem estar associadas proteínas, polissacarídeos e, no caso de bactérias gram-negativas, uma fração bastante significativa de lipopolissacarídeos.

Algumas bactérias apresentam externamente à parede uma camada mucosa que, quando [illegible] é chamada de *cápsula*. Essa tem natureza polipeptí-

dica ou polissacarídica e, em certos casos, é muito abundante, podendo então ter importância industrial, como sucede com as dextranas.

No citoplasma, além dos materiais em solução (sais minerais, aminoácidos, pequenas moléculas, proteínas, açúcares), encontram-se partículas, tais como: ribossomos, constituídos de RNA e proteína, onde ocorre a síntese proteica; grânulos de material de reserva, amido, glicogênio, lipídeos ou fosfatos.

O material nuclear (*nucleóide*) é constituído por um filamento duplo de DNA (cromossomo), não associado a proteínas e preso a uma invaginação da membrana citoplasmática (mesossomo). Ainda no citoplasma podemos encontrar *plasmídeos*, pedaços de DNA circulares menores que o cromossomo. Especificam informações que, embora importantes para a célula, não são essenciais ou indispensáveis.

Algumas bactérias móveis apresentam *flagelos*, filamentos longos constituídos de proteína contrátil, ligados a uma estrutura basal, localizada na membrana citoplasmática.

Entre outras estruturas dispensáveis, algumas bactérias apresentam *fímbrias* ou *pilos*, que servem para aderir a superfícies, permitindo a formação de biofilmes. Há que se destacar a existência de um tipo mais longo, as fímbrias sexuais, que serve de ponte entre duas células por ocasião da transferência de material genético de uma bactéria macho (F+) para uma bactéria fêmea (F-).

Menção especial deve ser feita a uma estrutura particularmente apresentada apenas por certos grupos de bactérias, o esporo. Representa uma fase na vida de certas bactérias que se transformam em esporos por motivos ainda imperfeitamente conhecidos. Consiste numa célula diferente da forma vegetativa normal: tamanho menor, material nuclear e citoplasma condensados, baixo teor de água, maior quantidade de cálcio e presença de ácido dipicolínico. Acima da membrana citoplasmática, o esporo é envolvido por várias camadas, que lhe confere um revestimento bastante espesso. O aspecto importante dos esporos bacterianos é sua considerável resistência aos agentes externos, principalmente à temperatura, a ponto de esporos resistirem a temperaturas superiores a 100°C durante várias horas. Ao contrário do que sucede com os esporos de outros organismos, não são formas de reprodução, pois cada bactéria se transforma em um esporo e este, encontrando eventualmente condições favoráveis, germina, produzindo apenas uma bactéria (Fig. 1.7).

A reprodução nas bactérias é feita, na grande maioria dos casos, pelo processo da divisão binária simples, na qual uma célula, atingindo um determinado tamanho, vai se alongar, dando duas células-filhas iguais.

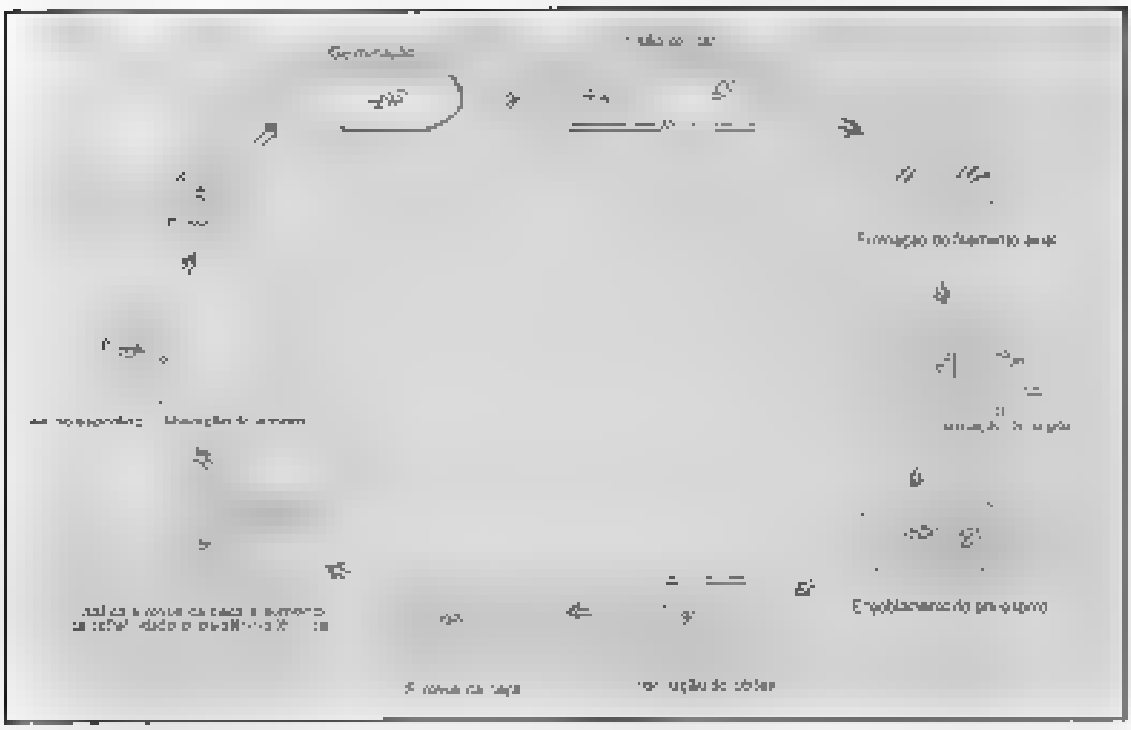


Figura 1.7 Esquema de formação do endósporo bacteriano.

2.2 Fungos

Os fungos são seres eucariotícos, heterotróficos, que não sintetizam clorofila, portanto não fazem fotossíntese, não armazenam amido como material de reserva, sim glicogênio e não tem celulose na parede celular, com exceção de alguns fungos aquáticos. São ubíquos, podendo ser encontrados no ar, solo, água, vegetais e animais.

Do ponto de vista morfológico, é conveniente distinguí-los em *leveduras* e *bolores*. Essa distinção não tem valor taxonômico, pois ambas as formas podem ser encontradas num mesmo grupo de fungos.

As leveduras são geralmente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa. O tamanho varia de 1 a 5 µm de diâmetro, a 5-30 µm de comprimento.

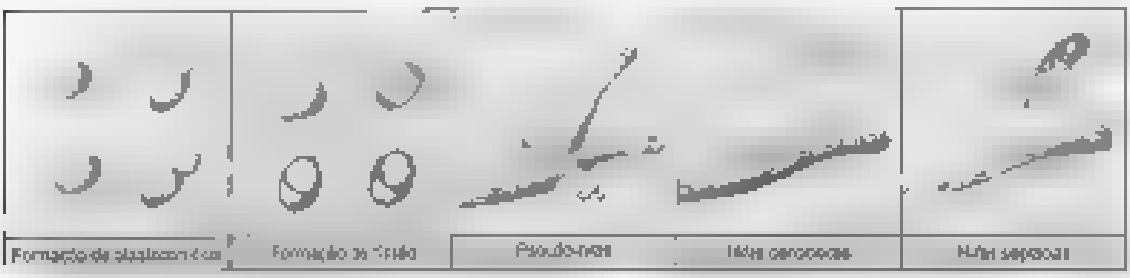


Figura 1.8 Formas de apresentação das leveduras (esquerda) e bolores (direita).

Os bolores são constituídos por células multinucleadas (cenócitos) que formam tubos chamados *hifas*, ao conjunto de hifas dá-se o nome de *micélio*. As hifas podem ser contínuas ou septadas (Fig. 1.8).

A célula fúngica (leveduras e bolores), tem *membrana citoplasmática* lipoproteica cuja função principal é regular as trocas com o meio ambiente. Possui uma *parede celular* rígida que confere resistência às pressões osmóticas e mecânicas. Sua natureza é polissacarídica em maior proporção, contendo também proteínas e lipídeos. No *citoplasma* encontram-se, além dos componentes usuais em solução, vacúolos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomas, materiais de reserva (gorduras e carbohidratos). O *núcleo* tipicamente eucariótico, contém nucléolo, vários cromossomas e histonas envolvidos por uma membrana nuclear (Fig. 1.9).

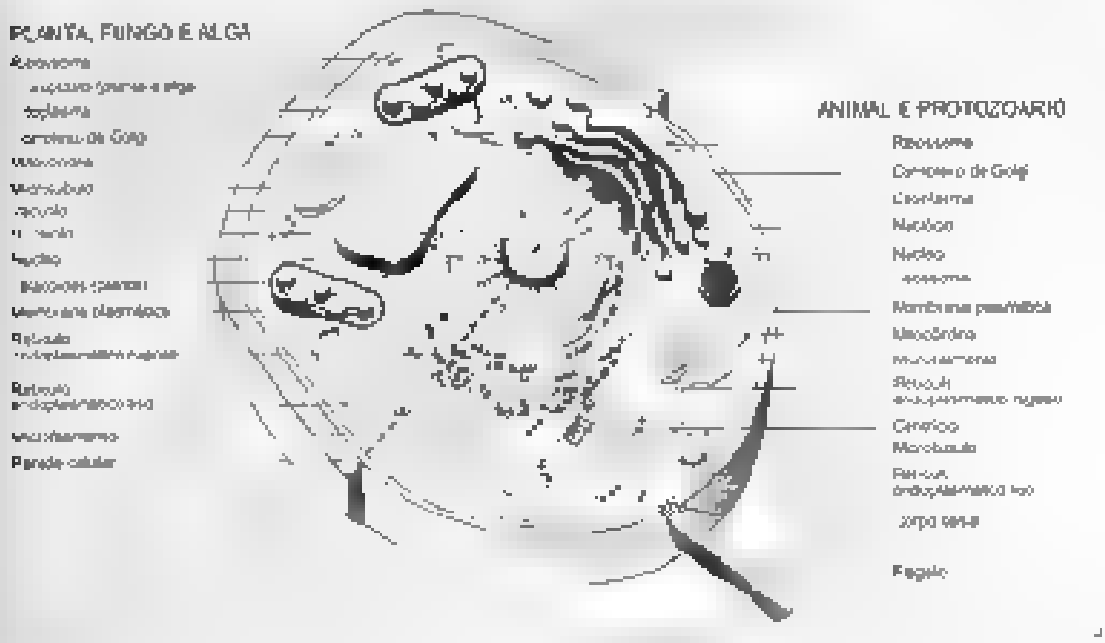


Figura 1.9 Representação esquemática da célula eucariótica animal e vegetal. As figuras auxiliares do meio [illegible] Fungos. Adaptado de Gerard J. Tortora, Berdell R. [illegible] et al. [illegible] 1995.

Os fungos aquáticos apresentam *flagelos* para sua locomoção e muitos fungos possuem *cápsula*.

Os *esporos* fúngicos têm uma importância toda especial, pois além de serem a forma mais freqüente de reprodução, são os principais veículos de disseminação. Os esporos podem ter origem assexuada ou sexuada. A maneira pela qual se formam e se dispõem, constitui elemento importante na identificação, particularmente nos bolores. Os aspectos fundamentais podem ser visualizados na Fig. 1.10.

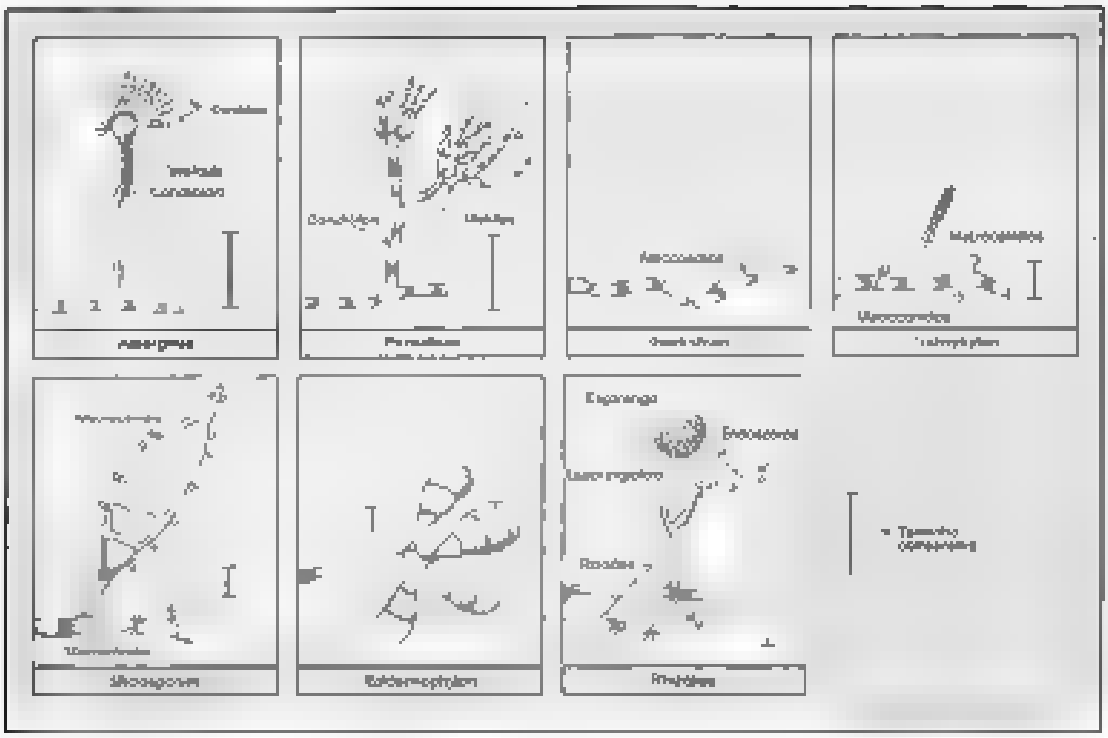


Figura 1.10 Exemplos de formação e localização dos esporos fúngicos. A barra comparativa representa 100 µm.

Conídios. Células isoladas ou em cadeias, localizadas na extremidade de uma hifa, o conidióforo, frequentemente se originando de uma célula especial, o esterigma; em outros casos, originam-se por brotamento do conidióforo.

Esporangiosporos. Esporos localizados no interior de um saco denominado esporângio, formado na extremidade de uma hifa.

Artroconídeos. Resultam simplesmente da fragmentação de uma hifa.

Clamidoconídios. Formados por uma célula qualquer do micélio, em torno da qual se desenvolve uma parede espessa. São mais resistentes que os outros tipos de esporos.

Na reprodução sexuada, os esporos são formados pela união de duas células e fusão de seus núcleos seguida de divisão, o que produz um número variável de células. Há, também, vários tipos conforme segue:

Ascosporos. Os esporos formados, em número de oito, ficam contidos no interior de um saco, ou asco, formado pela parede resultante da fusão das duas células iniciais.

Oosporos. Formados pela fusão de uma célula masculina pequena com uma célula feminina grande.

Basidiosporos. Esporos formados na extremidade de células especiais chamadas basídios. Caracterizam os cogumelos.

Esporos. Consequentes da fusão de duas células idênticas.

Semelhante aos bolores, as leveduras podem se reproduzir assexuada ou sexuadamente. No primeiro caso, o processo mais comum é o brotamento, do qual resultam células-filhas muitas vezes menores que a célula-mãe. A partir das leveduras reproduzem-se por cisão binária, como as bactérias.

A reprodução sexuada se faz pela formação de esporos, isto é, esporos contidos no interior de um asco.

1.3 – Nutrição microbiana

3.1 – Considerações gerais

Basicamente, as necessidades nutritivas dos microrganismos são as mesmas que as de todos os seres vivos, que precisam renovar seu protoplasma e fornecer-lhe as atividades, exigem fontes de energia e fontes de material plástico. Nos seres superiores, todavia, encontramos apenas dois tipos nutritivos:

a) os autótrofos, que são *fotossintetizantes* e obtêm energia da luz solar e, a partir do anidrido carbônico, sintetizam substâncias orgânicas;

b) os animais são *quimiotróficos*, obtendo energia das substâncias orgânicas e, portanto, dependem, por exigirem fontes orgânicas de carbono.

Entre os microrganismos, principalmente as bactérias, há uma variedade de tipos intermediários entre os dois tipos mencionados.

1.3.2 – Fontes de energia

As algas e algumas bactérias são fotossintetizantes. Nas primeiras, o pigmento principal é a clorofila, como nas plantas superiores; o processo é a água é utilizada como doadora de elétrons, com o desprendimento de oxigênio. Esse processo é importantíssimo, devido à produção de oxigênio, imprescindível à respiração aeróbia. Nas bactérias, o pigmento fotossintetizante é a clorofila vegetal, e não há produção de oxigênio, pois a água não é utilizada como doadora de elétrons. Bactérias que utilizam compostos inorgânicos, como, por exemplo, para esse fim são chamadas de *litotróficas*; as *organotróficas* são aquelas que extraem doadores orgânicos de elétrons.

Os fungos e a grande maioria das bactérias são *quimiotróficos*, obtendo energia das reações químicas, nas quais substratos adequados são oxidados. Os microrganismos litotróficos oxidam compostos inorgânicos, enquanto que os organotróficos oxidam compostos orgânicos. No primeiro grupo encontramos somente bactérias, algumas delas de importância médica, como, por exemplo, as bactérias do gênero *Nitrobacter*, que são capazes de oxidar o nitrito a nitrato, sulfurosa, por isso, utilizadas na recuperação de solos e minérios pobres, como de cobre, ou de urânio, através de processos químicos

[illegible] No segundo grupo encontramos os fungos, além de uma grande número de bactérias.

3.3 Fontes de material plástico

Para a [illegible] os elementos quantitativamente mais importantes são o carbono, o hidrogênio, o oxigênio, o nitrogênio, o enxofre e o fósforo.

[illegible] Para os seres vivos [illegible] o carbono é [illegible] dos compostos orgânicos.

[illegible] dos compostos orgânicos.

[illegible] na dos microrganismos heterotróficos.

[illegible]

[illegible] A gua são necessários em quantidades apreciáveis [illegible] quanto que de outros bastam [illegible] = oligoelementos. Dentre os primeiros [illegible] e nas síntese de ácidos nucleicos [illegible] necessário para [illegible] de [illegible] para a síntese de vitaminas e de hormônios [illegible] a sódio e de enzimas extracelulares e fator importante na osmorregulação [illegible] para a síntese de hormônios e de certos [illegible] O papel dos oligoelementos nas [illegible] bem [illegible] de [illegible] demonstrado em [illegible] outros.

[illegible] fatores de crescimento [illegible] organismos [illegible] determinados microorganismos [illegible] sintetizar. Tais fatores podem estar presentes no meio [illegible] microorganismo [illegible] Alguns desses fatores são vitaminas, em especial as complexo B. Outras vezes são aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos. As necessidades dos microrganismos nesse particular são muito diversas.

[illegible] dos aspectos importantes dessa nutrição é a [illegible] de um determinado fator [illegible] para o que ocorre quando o meio [illegible] mas [illegible] essa [illegible] permite a [illegible] de meios compostos [illegible] na medida de crescimento [illegible] de maneira [illegible] as principais [illegible]

3.4 – Água

A água não constitui um nutriente [illegible] e absorvente [illegible] para o crescimento dos microrganismos. Seu papel [illegible] múltiplo. Em [illegible] os microrganismos [illegible] partícula [illegible] se nutrem pela passagem de substâncias em solução através da membrana plasmática. A água [illegible] A água [illegible] na regulação da pressão osmótica [illegible] na regulação térmica. A maior [illegible] rapidamente pela dessecação.

1.3.5 – Oxigênio atmosférico

[illegible] recepção [illegible] processo [illegible] organismos [illegible]

[illegible] pequena quantidade de [illegible] as pressões [illegible] de [illegible] Alguns [illegible] microrganismos [illegible] toleram a presença [illegible] rapidamente dessas [illegible] oxigênio livre

[illegible] os [illegible] tempo [illegible] fungos [illegible]

1.4 – Meios de cultura

4.1 – Considerações gerais

[illegible]

4.2 – Composição dos meios de cultura

[illegible] água q.s.p. 1 L

[illegible] nem fonte de energia

[illegible] para [illegible] ções de aerobiose

Tabela 1.2 Composição química da célula bacteriana

Macromoléculas	Massa seca (%)	Massa celular (10⁻¹⁵ g)	Peso molecular	Número de moléculas por célula	Diferentes tipos de moléculas
Proteína	55,0	155,0	$4,0 \times 10^{4}$	2.360.000	1.050
RNA total	20,5	59,0			
23rRNA		31,0	$1,0 \times 10^{6}$	18.700	1
16rRNA		6,0	5×10^{6}	8.700	
5rRNA		1,0	$3,9 \times 10^{5}$	18.700	1
transferência		4,6	[illegible]	205.000	60
mensageiro		2,4	[illegible]	380	400
DNA	2,1	9,0	[illegible]	3	1
Lipídio	9	26,0	[illegible]	22.000.000	47
Lipopolissacarídeo	3,4	10,0	4346	1.200.000	1
Mureocomplexo	2,5	7,0	1904 m		1
peptídeo	2,5	7,0	[illegible]	4.360	1
Total de macromoléculas	96,1	273,0			
Material em solução	2,9	8,0			
Subunidades,			7,0		
vitaminas, metabólitos			1,0		
íons orgânicos	[illegible]	[illegible]			
Massa seca total	100,0	284,0			

Massa de uma bacteria: $9,5 \times 10^{-12}$ g

Conteúdo aquoso: $6,7 \times 10^{-13}$ g

Massa seca de uma bactéria: $2,84 \times 10^{-13}$ g

Há quatro classes de lipídeos, cada uma delas com composições variáveis de ácidos graxos.

Se a esse meio de cultura adicionarmos 5 g de glicose, de contaminação a ser enquadrado na definição de [illegible] contém apenas uma fonte orgânica de energia e carbono (glicose), permitindo o crescimento de quem organismos como, por exemplo, Escherichia coli, habitante normal do intestino dos mamíferos. Trata-se de um organismo de exigências mínimas, capaz de sintetizar, pois, a partir da glicose e dos sais minerais do meio, consegue fabricar todos os componentes da protoplasma. Se quisermos, contudo, cultivar uma bactéria com características nutritivas semelhantes à E. coli, o bacilo Salmonella typhi, será necessário, a partir da glicose, adicionar o aminoácido triptofano. S. typhi não consegue sintetizar triptofano, que para ela, como definimos

[illegible] ou fatores de crescimento. Outros [illegible] podem ser [illegible] permitindo o crescimento de um número cada vez maior de microrganismos. O meio [illegible] como seletivo, pois sua composição é sempre bem definida.

Se quisermos cultivar microrganismos mais exigentes nesse meio, podemos [illegible] capazes de [illegible] uma variedade grande de [illegible], como, por exemplo, extrato de leveduras. Nesse momento o meio passa a ser complexo, [illegible] um produto cuja composição [illegible] não é perfeitamente definida [illegible]. Na prática, a maior parte dos meios [illegible] complexo e os mais [illegible] [illegible] [illegible] como soja, arroz, ou outras como sangue, soro, etc.

4.3 – Estado físico dos meios de cultura

Os meios de cultura podem ser constituídos simplesmente por soluções de [illegible] os microrganismos com maior facilidade [illegible] o seu crescimento. Nesse tipo de meio [illegible] aparentemente [illegible] seu número [illegible]. Quando [illegible] de um tipo de microrganismo [illegible] [illegible] dependendo [illegible] características [illegible] microrganismo possam ser reconhecidas [illegible] para que [illegible] atividade [illegible] posteriormente [illegible] em cultura [illegible] outros.

Para [illegible] necessidade de [illegible]. Nesse caso, se o material for adequadamente [illegible] espalhamento [illegible] microrganismos [illegible] separados [illegible] formarão uma colônia [illegible] microrganismos [illegible] visível macroscopicamente e facilmente transferível para novo meio [illegible] crescimento em cultura pura.

Os meios sólidos são preparados [illegible] mais usado [illegible] [illegible] mas somente [illegible] de 45 °C [illegible] ágar no meio de cultura [illegible] portanto [illegible] natureza [illegible] ágar pode [illegible] de certos microrganismos [illegible]. Nesses casos [illegible] gel.

1.4.4 – Meios seletivos e diferenciais

Meios [illegible] características [illegible] o crescimento de certos microrganismos, permitindo apenas o crescimento de outros. O

gram-negativas

1.4.5 – Conservação dos microrganismos

solo ou sílica, previamente esterilizados.

[illegible] instituições especializadas que [illegible] armazenam e [illegible] bactérias [illegible] A [illegible] American [illegible] ection [illegible] ATCC

1.5 – Crescimento microbiano

5. – Considerações gerais

[illegible] *número* de indivíduos.

5.2 – Medida de crescimento

[illegible] determinado de várias formas

[illegible] pensão

são do meio de cultura [illegible] Para uma dada série de condições, todos [illegible] tais métodos são bastante sensíveis e [illegible]

[illegible] de condições experimentais

[illegible] de uma suspensão

5.3 – Crescimento exponencial

[illegible]

exponencial, isto é, o aumento de número ou massa se faz segundo uma progressão geométrica.

Tratando-se de microrganismos como bactérias, certas algas unicelulares e algumas leveduras que se multiplicam por divisão binária, temos

$$N = N_0 \cdot 2^n, \tag{1-1}$$

onde N é o número de microrganismos ao fim de n divisões (ou gerações) e N_0 é o número inicial.

Empregando os logaritmos dos números, temos

$$\log N = \log N_0 + n \log 2 \tag{1-2}$$

O número de gerações será:

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \tag{1-3}$$

A velocidade exponencial de crescimento, R, é expressa pelo número de gerações na unidade de tempo:

$$R = \frac{n}{t - t_0} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2 (t - t_0)} \tag{1-4}$$

A recíproca de R é o tempo de geração:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{t - t_0}{n} \tag{1-5}$$

Tais equações, entretanto, somente se aplicam a microrganismos que se dividem unicamente em condições que garantam 100% de viabilidade. Assim sendo, é mais conveniente aplicar-se uma equação mais geral, onde se leva em consideração a variação da massa X de protoplasma em função do tempo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \tag{1-6}$$

Isso significa que a velocidade de crescimento é proporcional à concentração de microrganismos num instante dado. A fração pela qual a população cresce na unidade de tempo é dada por μ, que representa a *velocidade específica de crescimento*:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \tag{1-7}$$

A integração da expressão (1-6) leva a:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \tag{1-8}$$

ou

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \qquad (1.9)$$

Transformando para logaritmos decimais

$$\log X = \log X_0 + \frac{\mu}{2,3}\, t \qquad (1.10)$$

Projetando-se num gráfico os valores do log X contra o tempo, obtem-se uma reta característica do crescimento exponencial.

1.5.4 – Fases do crescimento microbiano

É óbvio que numa cultura descontínua as condições não permanecem ideais por muito tempo. Logo a quantidade de nutrientes começa a diminuir e produtos do metabolismo microbiano vão se acumulando cada vez mais. Essas modificações têm uma considerável influência sobre o crescimento dos microorganismos. Construindo-se um gráfico global do crescimento microbiano em cultura descontínua em meio líquido, observa-se que a curva representativa desse crescimento apresenta várias fases (Fig. 1.11).

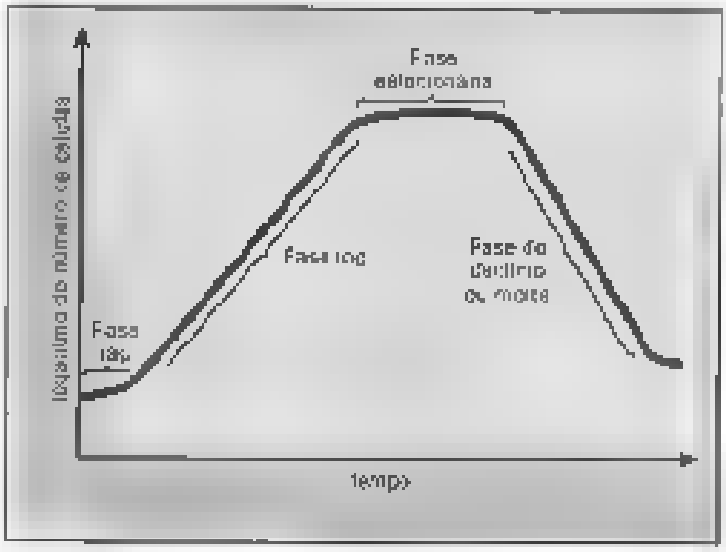


Figura 1.11 Fases da curva de crescimento microbiano

a) *Fase de lag*: inicialmente há um período em que contagens não revelam aumento no número. Determinações de massa celular, por exemplo, demonstram que há um aumento, reflexo de um aumento no tamanho dos indivíduos. Essa fase só ocorre quando os microorganismos semeados provêm de uma cultura em que não mais há crescimento exponencial. É a consequência de uma necessidade de renovação dos microorganismos que, em culturas ve-

[illegible] fase de *lag*.

[illegible] bolismo etc.).

[illegible] de O.

[illegible] mite um rendimento maior.

[illegible] ficiente de alimento.

[illegible]

pois a difusão de oxigênio não se faz suficientemente depressa para suprir as necessidades daqueles localizados nas camadas mais profundas do meio.

d) *Fase de declínio*. Depois de um certo tempo, o número de organismos que morre torna-se progressivamente superior ao dos que surgem. Eventualmente a cultura se esteriliza. A duração dessa fase é, também, extremamente variável.

1.5.5 – Cultivo contínuo

O que foi descrito refere-se a um crescimento em cultura descontínua, no qual o meio de cultura não é renovado. Nesse tipo de cultura é fácil observar que, a partir do momento em que o meio é inoculado, as condições começam a variar de forma progressiva. Embora muitos estudos possam ser realizados à efeito com pleno êxito nessas condições, seria ideal estudar o crescimento microbiano de maneira tal que todos os parâmetros se mantivessem constantes. Isso se tornou possível com o processo de cultura contínua, em que novo meio de cultura é adicionado constantemente ao sistema, do qual se retira um volume correspondente. Um esquema do quimiostato encontra-se na Fig. 1.12.

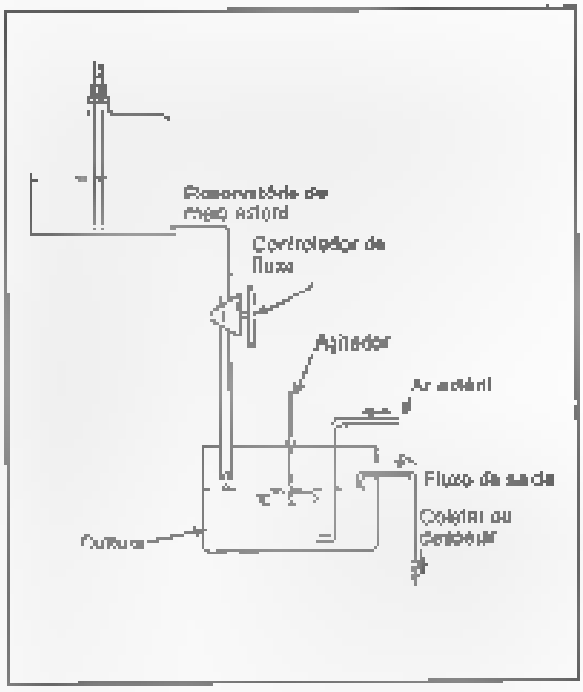


Figura 1.12 Esquema de quimiostato

O estudo do cultivo contínuo de microrganismos faz parte dos objetivos do Capítulo 2 do Volume 2.

1.5.6 – Fatores que influem no crescimento

[illegible]

mesófilos: cujo ótimo está entre 20 e 40°C

[illegible]

solo, cereais etc.: o ótimo se situa entre 20 e 30°C

[illegible]

d) *Agitação*. Uma das consequências da agitação é promover uma melhor aeração do meio, favorecendo o crescimento de aeróbios e aerotolerantes. Além disso, ao retardar a agitação promove uma homogeneização dos nutrientes no meio de cultura e uma dispersão dos produtos metabólicos, o que também favorece o crescimento de maneira apreciável, inclusive de microrganismos anaeróbios.

6 – Controle dos microrganismos pela ação dos agentes físicos

6.1 – Considerações gerais

Denomina-se *esterilização* o processo pelo qual são mortos, inativados e/ou reversivelmente ou retirados todos os organismos de um material ou suspensão, inclusive as formas esporuladas. Geralmente os processos empregados para esse fim são processos físicos, por serem mais eficientes e, com algumas exceções, menos dispendiosos que os químicos.

6.2 – Temperatura

De todos os processos empregados para matar microrganismos, o calor é, sem dúvida alguma, o mais eficiente e econômico. Pode ser empregado de duas maneiras: seco e úmido. O calor seco age promovendo uma oxidação violenta de componentes do protoplasma, sua eficácia é comparativamente baixa, pois não tem muita capacidade de penetração. Além disso, não é todo tipo de material que pode ser submetido às temperaturas necessárias para esterilização por calor seco (160 a 180°C durante um tempo mínimo de uma ou duas horas). Emprega-se para vidraria, óleos ou pós, nem todo material metálico pode ser esterilizado à seco: certos instrumentos de aço podem perder a dureza ou a têmpera. O processo da *flambagem* utilizado nos laboratórios de microbiologia para esterilizar alças e fios de platina consiste em passar-se o material diretamente na chama do bico de Bunsen.

O calor úmido é muito mais eficiente. Age promovendo a desnaturação de proteínas e dissociação de lipídeos, o que também contribui para interferir no primeiro efeito. Tem alta capacidade de penetração e pode ser utilizado para uma grande variedade de materiais, inclusive biológicos. A temperatura de 60°C durante uma hora é suficiente para matar as formas vegetativas de todos os microrganismos, exceto alguns termofílicos, na ausência de esporos. A 100°C as formas vegetativas morrem em poucos minutos, se mantida essa temperatura durante 15 minutos, morre também a maioria dos esporos. Há, contudo, esporos, principalmente de saprófitas, que podem resistir ao aquecimento a 100°C durante várias horas, suportando mesmo temperaturas um pouco mais altas. Para matar qualquer microrganismo, inclusive todos os tipos de esporos, emprega-se vapor d'água aquecido a 120°C, sob uma pressão de uma

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] matar uma colônia de [illegible] são necessários [illegible] quantidade no caso dos [illegible] apenas [illegible] quando se trata de [illegible] [illegible] seringas, agulhas e outros materiais descartáveis têm sido esterilizados [illegible] esse processo.

1.6.4 Filtração

A passagem de soluções ou gases através de filtros de porosidade entre pequenos e muito pequenos microorganismos pode ser empregada na remoção de [illegible] e fungos, de modo que também passam a ser [illegible] [illegible]

As [illegible] porosas de [illegible] foram muito usadas [illegible] passado e atualmente são empregadas membranas filtrantes de nitrocelulose [illegible] esse fim.

A filtração tem como principais aplicações a esterilização de soluções termossensíveis e na entrada de salas e ambientes onde qualquer tipo de gérmen é indesejável. Mas, [illegible] a esterilização do ar que é borbulhado em meios de cultura será [illegible] empregados filtros de [illegible]

1.6.5 Vibrações sônicas

Sons audíveis têm uma frequência que não ultrapassa 24 kHz, entre 1 e [illegible] Kz. As frequências são superiores a acima de 20 kHz são ultra-sônicas. Alguns microorganismos são sensíveis a vibrações ultra-sônicas, sendo [illegible] por isso extravasamento de [illegible] Uma das explicações para o [illegible] se deve à [illegible] gases dissolvidos em líquidos sob [illegible] a essas vibrações sofrem de solução sob a forma de microbolhas e estas são violentamente agitadas, chocando-se contra as paredes microbianas, rompendo-as. Vários [illegible] para a [illegible] mecanismos têm sido utilizados permitindo a obtenção de frações independentemente de um tratamento que [illegible] permite a [illegible] de partículas inertes, como a [illegible]

1.7 – Controle pela ação de agentes químicos

7.1 – Considerações gerais

Classicamente, os agentes químicos empregados na matar ou inibir microorganismos são classificados em dois grandes grupos: desinfetantes e agentes quimioterápicos.

Os primeiros são substâncias que agem diretamente sobre estruturas microbianas, causando a morte do microorganismo. Não mais necessariamente todos os microorganismos, [illegible] de tal forma que os indesejáveis não se processam mais no interior do processo. As principais estruturas e moléculas alvos são a parede, a membrana citoplasmática, sensíveis aos agentes capazes de [illegible] os que compõem as proteínas e ácidos nucleicos ou estruturas [illegible]. Os [illegible] de ação são os mais diversos, como

[illegible]

[illegible]

ciclina etc

[illegible]

gundo (quimioterápicos)

[illegible]

entes serão afetados de forma diversa pelas condições de uso. Assim, tem grande influência na atividade dos desinfetantes o fator de diluição. Verificou-se ser válida a equação

$$C^n \cdot t = K$$

onde C é a concentração, t o tempo, n o coeficiente de diluição e K uma constante. Desinfetantes como o fenol e derivados tem n = 1, isso significa que sendo diluído à metade o tempo necessário para se obter o mesmo efeito será o dobro. Já o bicloreto de mercúrio tem n = 6. Sendo diluído à metade o tempo de ação aumentará sessenta e quatro vezes. Por esse motivo, a rigor deve se preferir avaliar a atividade dos desinfetantes com provas realizadas nas condições de uso.

Outros fatores influem consideravelmente na atividade dos desinfetantes: temperatura, pH, presença de sais e, principalmente, presença de proteínas estranhas. Certos agentes extremamente ativos [illegible] perdem quase totalmente sua atividade quando em presença de matéria orgânica, [illegible] na [illegible] de sua grande atividade por ela. É o que sucede, por exemplo, com os compostos de mercúrio.

7.3 Principais grupos

Não há uma classificação única aceita de tal forma que apresentaremos os agentes químicos em grupos que tenham em comum as ações químicas (álcoois, aldeídos, etc.) ou elementos químicos (halogênios, metais pesados, etc.) ou pelo menos de ação: agentes oxidantes, agentes de superfície, etc.). Cabe lembrar ainda que não raro os compostos citados abaixo podem ser seu emprego como esterilizante, desinfetante, antisséptico ou até mesmo vasoconstritor, devem, entretanto, serem consultados livros especializados quanto à concentração, tempo de contato, modo de emprego.

Álcoois: etílico, isopropílico, propilenoglicol, etilenoglicol.

Aldeídos: fórmico (formol), glutárico.

Fenóis: fenol, cresol, timol, clorocresol, cloroxileno.

Ácidos orgânicos: acético, lático, benzóico, caprílico.

Halogênios: iodo, cloro, ácido hipocloroso, cloraminas, hipoclorito.

Metais pesados: sais de mercúrio, prata, cobre, zinco.

Agentes oxidantes: água oxigenada, permanganato de potássio.

Agentes de superfície: cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, cloreto de cetilpiridínio, clorohexidina.

Gases: óxido de etileno, óxido de propileno, Beta-propiolactona, dióxido de cloro, ozônio.

Bibliografía

NEDHARDT F.C. INGRAHAM J.L. SCHAECHTER M. **Physiology of the bacterial cell.** Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1990.

BROCK T.D. MADIGAN M.T. MARTINKO J.M. PARKER J. **Biology of Microorganisms.** Prentice-Hall, 7th edition. 1994.

TALARO, K., TALARO, A. **Foundations in Microbiology.** Wm.C. Brown Publishers, 1993.

PRESCOTT L.M. HARLEY J.P. KLEIN D.A. **Microbiology.** Wm.C. Brown Publishers 2nd edition. 1993.

GERHARDT P. MURRAY R.G.E. WOOD W.A. KRIEG N.R. **Methods for general and molecular bacteriology.** American Society for Microbiology. 1994.

2 TÉCNICAS BÁSICAS EM MICROBIOLOGIA

M. Ligia C. Carvalhal

2.1 – Segurança no laboratório

Em microbiologia, trabalhar bem significa trabalhar com segurança

Qualquer estudante ou profissional que lida com microrganismos no seu dia-a-dia está consciente de que está manuseando organismos que podem estar vivos, organismos patogênicos ou potencialmente [illegible]. Como boa profissional deve conhecer portanto as normas de segurança que orientam o trabalho em um laboratório, antes mesmo do início [illegible] de prática. Estamos aqui arrolando algumas regras importantes no [illegible] do trabalho em laboratório de microbiologia.

1. Ao entrar no laboratório, colocar os casacos e outros objetos de uso [illegible] em local apropriado, longe sobre a bancada de trabalho.

2. Enquanto no laboratório, vestir sempre um avental abotoado ou fechado por baixo, cobrindo a maior parte do corpo. Não sair do laboratório com o avental.

3. Fechar portas e janelas durante o trabalho em laboratório de microbiologia para evitar contaminações originadas pelas correntes de ar.

4. Limpar e desinfetar a bancada antes e após seu uso. As paredes e o chão do laboratório também devem estar sempre bem limpos.

5. Lavar as mãos com sabão ou detergente antes e depois de executar o trabalho.

6. Não colocar nada na boca. Não comer, beber ou fumar dentro do laboratório. Não aspirar, usar pipetadores de borracha ou automáticos.

[illegible] do bico de gás

[illegible] Trabalhar [illegible] gem e esterilização dos mesmos

[illegible] fim de evitar acidentes

[illegible] contaminação do ambiente com esporos

2.2 – Preparo de meios de cultura

Chamamos de meio de cultura a conjunto de nutrientes necessários para que ocorra o metabolismo ou multiplicação dos microorganismos

[illegible] nesta [illegible] Cap 1, item 1.6.

O que é um inóculo? O que é inocular? O que é uma cultura?

[illegible]

[illegible]

De acordo com o estado físico, os meios de cultura têm usos específicos e devem ser acondicionados de forma apropriada

[illegible]

(a) (b) (c) (d) (e)

Figura 2. [illegible]

Os meios sólidos, ao contrário dos líquidos, podem ser acondicionados em tubos ou frascos na posição horizontal ou inclinada, ou em placas de Petri de vidro ou de plástico do tipo descartáveis ou esterilizáveis (Fig. 2.2). O meio líquido pode ser esterilizado dentro de um tubo ou de um frasco. O mesmo não ocorre com o meio sólido quando em placa. Para se obter uma placa com meio de cultura sólido, este deve ser previamente esterilizado em frasco apropriado e, a seguir, quando ainda líquido (temperatura em torno de 50°C), derramado dentro de uma placa esterilizada. Ao se preparar tubos ou frascos com meios de cultura do tipo sólido e inclinado, estes poderão ser esterilizados dentro do tubo a ser utilizado e, após esterilização, inclinado até o seu resfriamento.

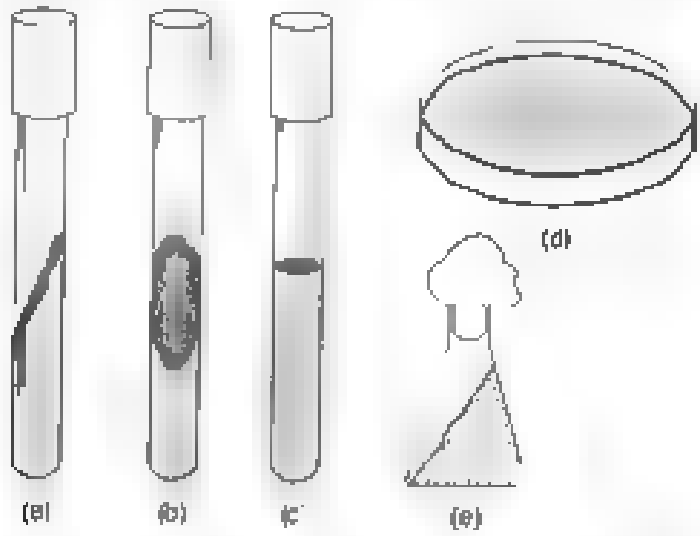


Figura 2.2 Meio de cultura sólido acondicionado em: (a) tubo de ágar inclinado; (b) tubo de ágar inclinado; (c) posição vertical; (d) tubo de ágar inclinado; (d) placa de Petri; (e) estriamento em ágar inclinado.

Tipos de meios de cultura: básal, de enriquecimento, seletivo, diferencial, sintético ou quimicamente definido, complexo e de transporte

Os meios de cultura devem ser utilizados de acordo com os objetivos do experimento. A composição química (quantidade e quantidade de nutrientes) de um meio de cultura pode variar em uma ordem de grandeza quase infinita. Ao cultivarmos uma bactéria quimiolitotrófica (ver Cap. 1, item 1.3), por exemplo, podemos recorrer a um meio de cultura contendo simplesmente uma solução de sais inorgânicos tendo o CO_2 como fonte de carbono. Já uma bactéria quimiorganotrófica, como a *E. coli*, necessita da presença de um substrato orgânico como fonte de energia e carbono. Muitos microrganismos são capazes de crescer e multiplicar em um meio de cultura *básal* (Tab. 2.1). Outros, mais exigentes, só crescerão se, no meio básal, forem acrescentados outros nutrientes. Chamamos de meio de enriquecimento o meio básal, acrescido de outros nutrientes. Os meios de enriquecimento são usados quando quere-

mesmo conteúdas no meio.

conhecidos, são chamados de *complexos*

Tabela 2.1 Tipos de meios de cultura e suas respectivas composições químicas

MEIOS DE CULTURA	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS (g/L)
Meios basais:	
Água de peptona	Peptona (produto solúvel resultante da hidrólise de proteínas), 10; cloreto de sódio, 5.
Caldo nutriente	Peptona, 10; cloreto de sódio, 5; extrato de carne, 10.
Ágar nutriente	Caldo nutriente solidificado com ágar, 15.
Ágar Sabouraud glicose	Peptona, 10; dextrose, 40; ágar, 15.
Meios de enriquecimento:	
Ágar sangue	Ágar nutriente acrescido de sangue desfibrinado ou citratado, 50 a 100mL/L de meio.
Caldo de selenito	Peptona, 5; manitol, 4; fosfato dibásico de sódio, 10; selenito de sódio ($NaHSeO_3$), 4.
Meios seletivos:	
Ágar desoxicolato citrato	Extrato de carne e peptona, 10; citrato de sódio, 10; citrato férrico de amônio, 1; desoxicolato de sódio, 5; vermelho neutro, 0,02; ágar, 15.
Caldo Mac Conkey	Peptona, 20; sais biliares, 15; cloreto de sódio, 5; fosfato ácido de sódio, 5; vermelho neutro, 0,03.
Meio diferencial:	
Ágar Mac Conkey	Caldo Mac Conkey acrescido de ágar, 15.
Ágar amido	Amido, 10; extrato de carne, 3; peptona, 5; ágar, 15.
Meio de transporte:	
Ágar glicerol	Glicerol, 5; extrato de levedura, 2; fosfato dibásico de potássio, 1; ágar, 5.

Os meios de cultura devem ser preparados e esterilizados segundo procedimentos básicos.

A maior parte dos meios de cultura estão disponíveis comercialmente na forma de pó. Para meios líquidos o pó é simplesmente pesado e dissolvido em água destilada ou deionizada. Quando se trata de meios sólidos, por exemplo, ágar nutriente, após pesagem e dissolução em água, o meio deve ser aquecido até a total dissolução do ágar. Cada vez, alíquotas são colocadas em frascos apropriados e esterilizados por autoclavagem (Clave, 1.3), não se esquecendo de tomar estimados a aproximadamente 45°C e derramados em placas previamente estéreis

gra das calcula-se aproximadamente 20 a 25 mL de meio para placas de 9,0 cm de diâmetro. As placas não devem ser movimentadas, a fim de que o meio se solidifique sobre a cultura. Algumas técnicas de semeadura exigem que a superfície do meio sólido esteja ainda líquido. Uma maneira de prevenir a evaporação do meio é derramá-lo na placa com temperatura em torno de 50°C suficiente para que não ocorra a solidificação antes de completar a concha. Caso permaneçam gotas na superfície do meio, estas poderão ser eliminadas mantendo-as em a tampa ligeiramente aberta dentro de uma estufa a 37°C ou em uma câmara de fluxo laminar. Alguns meios contendo nutrientes termossensíveis não podem ser esterilizados por autoclavação, utiliza-se para tanto o sistema de filtração (Fig. 2.3).

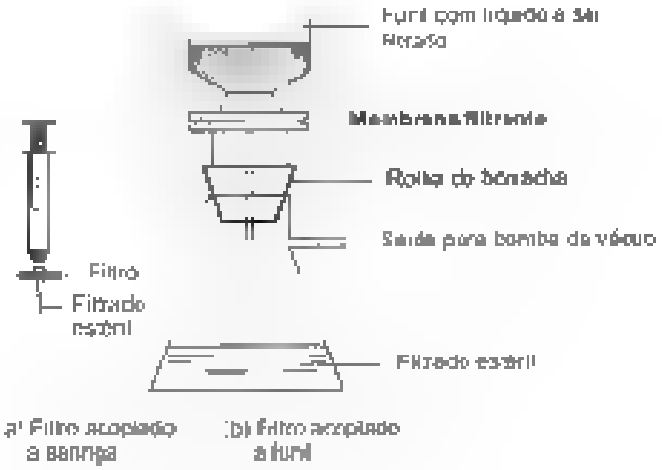
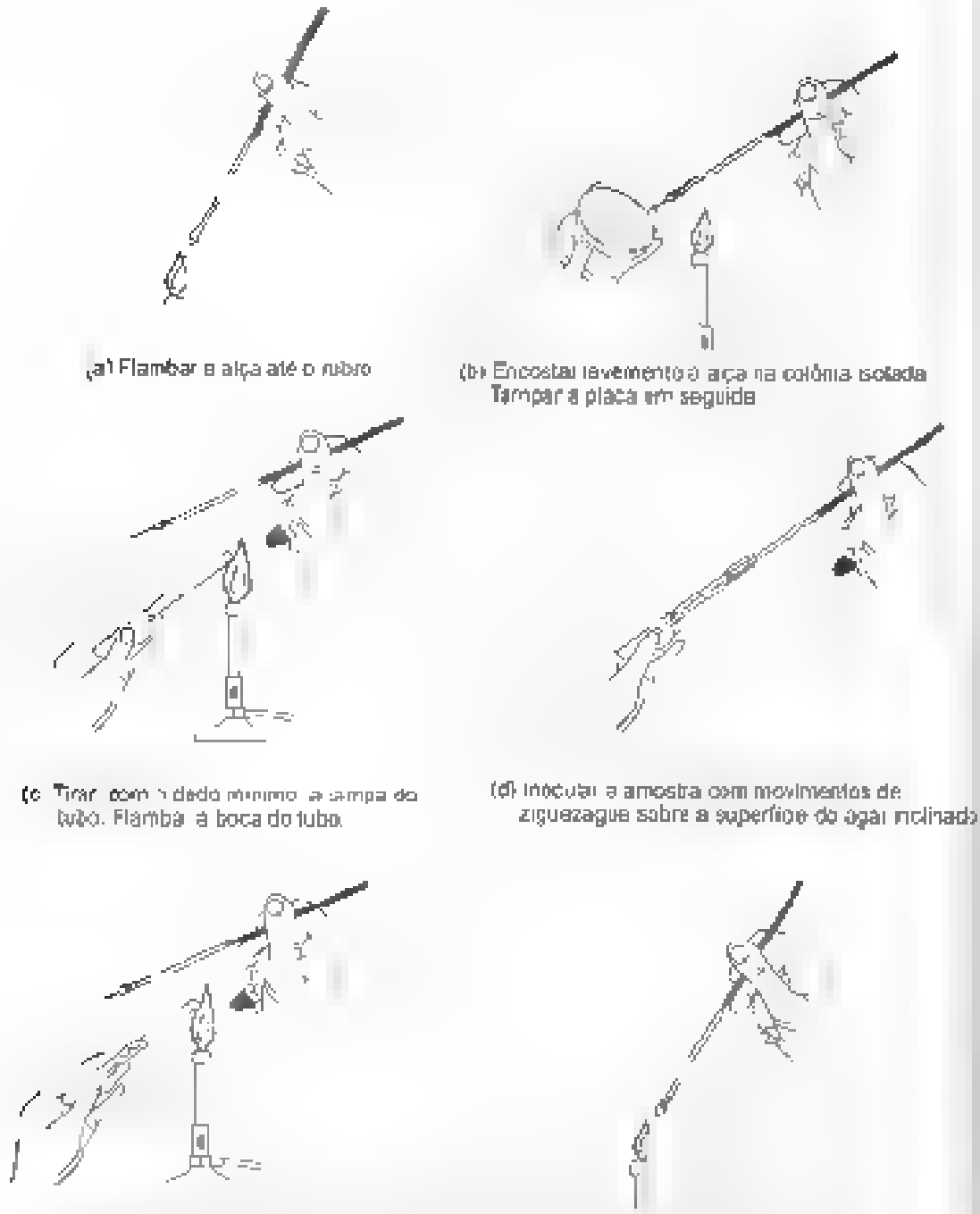


Figura 2.3 Sistema de esterilização por filtração.

2.3 – Técnicas de assepsia

As técnicas de assepsia impedem a contaminação de instrumentos e meios de cultura antes e durante o seu manuseio.

As técnicas de assepsia envolvem os procedimentos responsáveis pela esterilização de instrumentos a serem utilizados, por exemplo, quando submetemos a alça e fio de inoculação à queima pela chama do bico de Bunsen — Fig. 2.4a e 2.4b — e os procedimentos responsáveis pela manutenção da condição de esterilidade, seja pelo impedimento do contato dos materiais com objetos ou superfícies não estéreis como os dedos, a superfície da bancada, etc. Dessa forma, frascos esterilizados, vazios ou não, devem ser mantidos sempre fechados, ou ficarem abertos por menor tempo necessário para sua utilização. Para evitar a contaminação de um material, seja este um



(a) Flambar a alça até o rubro

(b) Encostar levemente a alça na colônia isolada. Tampar a placa em seguida

(c) Tirar com o dedo mínimo a rampa do tubo. Flambar a boca do tubo

(d) Inocular a amostra com movimentos de ziguezague sobre a superfície do ágar inclinado

(e) Flambar a boca do tubo antes de fechar

(f) Flambar a alça ou o fio imediatamente após o uso

Figura 2.4 Técnica de inoculação de microrganismos. Tomado de: Alcamo, I. E. Microbiology. A laboratory manual. 1986. 4ª ed. Capa: Sherman Oaks: Benjamin/Cummings Publ. Comp. Inc.

[illegible] ste ou do frasco, [illegible] a cultura para [illegible] a borda [illegible] ser rapidamente passada na chama do bico de Bunsen, imediatamente após a sua abertura e antes de ser fechado (Figs. 2.4 e 2.5). Essa prática [illegible] que os entulhos e organismos [illegible] presentes nessa região [illegible] do frasco, comprometendo [illegible] a cultura. Esse procedimento [illegible] foi [illegible] (Cap. 1, item 1.5.2) e deve ser utilizado durante a retirada de amostras, inoculações ou semeaduras em meios sólidos contidos em frascos. Lembramos aqui a necessidade de adotar um sistema para [illegible] a tampa não [illegible] que exposta à contaminação, por exemplo, [illegible] a colocam [illegible] erradamente sobre a bancada. Para tanto, a [illegible] se [illegible] do dedo mínimo para segurar a tampa do tubo durante todo o tempo de manuseio (Fig. 2.4c, d e e).

Para evitar a contaminação de um meio de cultura sólido contido em placa, existem técnicas de assepsia apropriadas.

[illegible] a [illegible] a tampa da placa deve ser mantida sobre a bancada, com a [illegible] para cima, [illegible] mais próxima possível da chama do bico de Bunsen, [illegible] a placa contendo o meio de cultura é segurada com a mão esquerda [illegible] perto da chama (Fig. 2.4b). Como alternativa, pode ser utilizado o [illegible] descrito na p. 24, [illegible] a [illegible] da assepsia [illegible] da placa.

2.4 – Instrumentos do microbiologista

Para inocular ou repicar os microrganismos recorremos a instrumentos especiais.

As técnicas que envolvem a transferência de microrganismos de um lugar para outro utilizam os seguintes instrumentos (Fig. 2.5): *a*, *b*, agulha [illegible] ou de arame, [illegible] e pipetas. [illegible] Esses instrumentos encontrados atualmente na forma descartável ou na forma esterilizáveis [illegible] de [illegible] respectivamente [illegible] dos pelas [illegible] Todos esses [illegible] podem ser utilizados desde [illegible] esterilizados em [illegible] ou autoclave. A [illegible] de um [illegible] utilizados imediatamente antes de seu uso. Para [illegible] as partes [illegible] que permanecem na chama do bico de Bunsen, [illegible] e cobre [illegible] (Fig. 2.4b). Antes [illegible] a cultura, a fim de impedir a [illegible] dos microrganismos, a alça [illegible] ser esterilizada [illegible] superfície [illegible] ou no ambiente, desde que [illegible] lhando em câmara de fluxo de ar).

[illegible] A flambagem [illegible] que [illegible] dados [illegible] do [illegible] de [illegible]

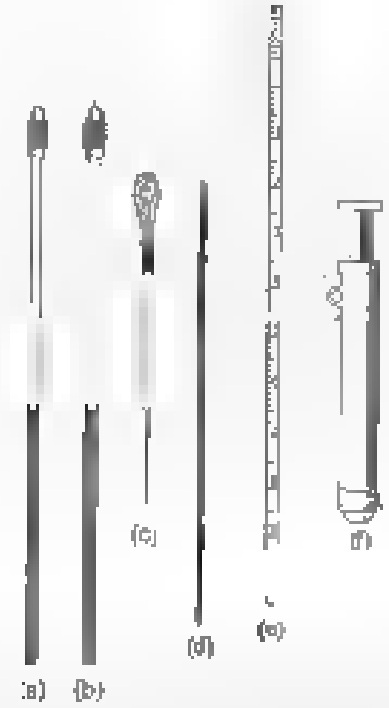


Figura 2.5 [illegible] (a) [illegible] alças de inoculação; (b) [illegible] alças de diâmetro [illegible]; (c) [illegible] pipeta Pasteur; (d) [illegible] pipeta sorológica; (f) pipetador mecânico com bomba de plástico.

2.5 – Métodos de inoculação

Procedimentos para inoculação com líquidos contendo microrganismos.

Quando uma alça estéril é mergulhada em uma suspensão contendo microrganismos e a seguir retirada do meio, forma-se na alça uma película líquida circular contendo um determinado número de microrganismos. Essa "alçada" é chamada de inóculo, o tamanho deste inóculo vai depender de dois fatores perfeitamente controláveis: concentração de células na suspensão (item 2.8) e diâmetro da alça, normalmente comportam volumes que variam de 0,005 a 0,01 mL. O fio de platina também pode ser um instrumento para inocular suspensões, uma vez que um pequeno volume de líquido fica aderido ao metal. A pipeta Pasteur e a pipeta sorológica podem ser usadas para inocular volumes variáveis, dependendo da graduação, desde que acopladas a sistemas pipetadores ou peras de borracha que garantam a segurança do trabalho (Fig. 2.5).

2.5.1 Inóculos líquidos em meios líquidos

A partir de uma suspensão contendo microrganismos, podemos inocular meios líquidos, mergulhando nestes uma alçada contendo os microrga-

-mos. Da mesma forma, esse tipo de inoculação pode ser feito com pipetas bacteriológicas ou do tipo Pasteur, simplesmente gotejando o inóculo, lentamente, no meio líquido a ser inoculado. Imediatamente após a inoculação (Fig. 2.5.1), as alças e os fios devem ser novamente flambados até o rubro, para evitar a contaminação do indivíduo ou do ambiente de trabalho. Com essa finalidade, as pipetas devem ser imediatamente imersas em solução desinfetante.

2.5.2 - Inóculos sólidos em meios líquidos

A alça e o fio de platina podem ser usados para retirar pequenas quantidades de material sólido, por exemplo, microrganismos crescidos antes de sua colônia em meio de cultura sólido (Fig. 2.4b). Para tanto, basta tocar a alça ou o fio no material, a quantidade de material ou o número de microrganismos retidos na superfície da alça ou do fio não é muito grande e, consequentemente, este método de inoculação só poderá ser usado quando este parâmetro não for importante. A alça ou o fio, contendo os microrganismos, é mergulhado no meio líquido e lentamente agitado para a liberação do inóculo.

2.5.3 - Líquidos ou sólidos em meios sólidos

Meios sólidos podem ser inoculados de muitas maneiras, dependendo do objetivo específico. Estamos a seguir algumas técnicas mais comuns e seus respectivos objetivos.

- Semeadura para obter áreas de colônias isoladas ou semeadura em estrias.

Essa técnica é usada quando o inóculo líquido, no caso, contém diferentes microrganismos ou muitos microrganismos de uma mesma espécie e desejamos obter colônias bem separadas. Nessa técnica o inóculo é progressivamente espalhado de forma a promover a separação das células na superfície do meio sólido. A Fig. 2.6 mostra esquematicamente a sequência de procedimentos a serem seguidos para a obtenção de colônias isoladas. A mesma mostra a Fig. 2.6 durante a semeadura em estrias, a alça deve ser mantida na posição correta, a fim de evitar rasuras no ágar. Entre cada estria A, B ou C, a alça deve ser flambada para eliminar os microrganismos remanescentes na mesma. Como é mostrado, parte do princípio de que cada célula originará uma colônia após incubação por tempo determinado, o espaço onde as células vierem sendo suficientemente separadas umas das outras apresentará colônias isoladas. Cada colônia isolada corresponde a uma cultura pura.

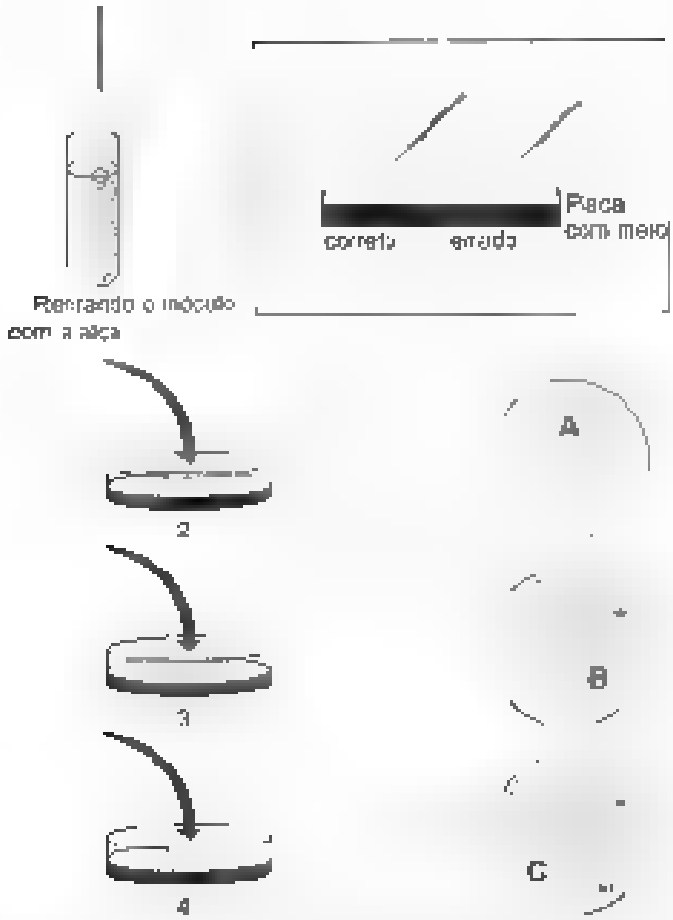


Figura 2.6 [illegible]

2.5.3.2 Semeadura em profundidade e superfície

Esse método é usado quando queremos crescer microrganismos simultaneamente em condições de sem-anaerobiose e com aerobiose. Para isso, usamos o *meio sólido inclinado em tubo* (Fig. 2.2). Espetamos a fio de platina contendo o inóculo na base do meio de cultura sólido, retirando-a em seguida e passando-a levemente em ziguezague pela superfície do mesmo meio (Fig. 2.4c). Dessa forma, o inóculo fica distribuído na base, condição de anaerobiose, e na superfície do meio, condição de aerobiose.

2.5.3.3 – Semeadura com espalhamento em superfície

Também chamada de semeadura para contagem de colônias, esta técnica consiste no espalhamento de um inóculo contido em um pequeno volume, normalmente entre 0,05 e 0,[illegible] mL, sobre a superfície de um meio de cultura so-

do em placa. Para garantir o espalhamento de colônias isoladas para a contagem, o inóculo deve ser previamente diluído e espalhado com uma alça de Drigalski (bastão de vidro em forma de L) com movimentos leves e uniformes (Fig. 2.7).

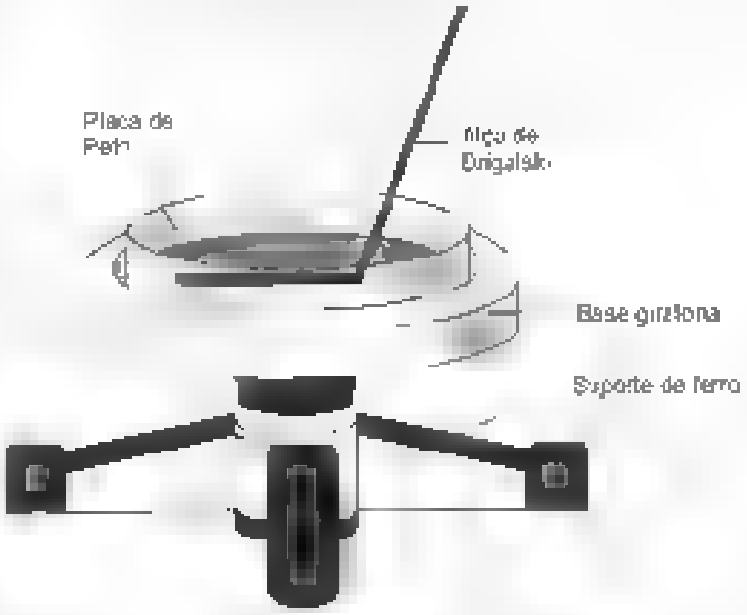


Figura 2.7 – Se[illegible] alça de Drigalski [illegible] uniforme do inóculo.

2.5.3.4 – Semeadura em camada

Essa técnica tem como objetivo a obtenção de um crescimento abundante em toda a superfície do meio de cultura sólido contido em placa, ou em meio em outro frasco. Para tanto, pode ser utilizado um inóculo líquido ou sólido, contendo um número grande de células. A semeadura pode ser feita por derramamento de determinado volume e posterior espalhamento. Para o espalhamento podem ser usados diferentes instrumentos, como "swab" (pedaço compactado de algodão preso na ponta de um palito de madeira ou de metal), alça de Drigalski, alça de platina ou mesmo por combinação de instrumentos (por exemplo, primeira inoculação com o "swab" contendo o inóculo e espalhamento subseqüente com alça de platina).

2.5.3.5 – Semeadura por derramamento

Com o mesmo objetivo da técnica descrita no item 2.5.3.2, esta técnica é usada para obtenção de crescimento em condições de aerobiose, sob a superfície do meio, e anaerobiose, profundidade do meio, com meio de cultura sólido contido em placa de Petri. Para [illegible] o inóculo é semeado e o

meio sólido estéril, vertido em tubo (aproximadamente 20ml — temperatura em torno de 40°C) imediatamente após a adição do inóculo. O meio é acondicionado em placa e posteriormente até cobrir homogeneamente todo o fundo da mesma. Após esfriamento, a placa é incubada por tempo e temperatura adequados. O crescimento das colônias pode ser observado em toda a profundidade do meio conforme as características aeróbias e anaeróbias do microrganismo semeado (Fig. 2.8).

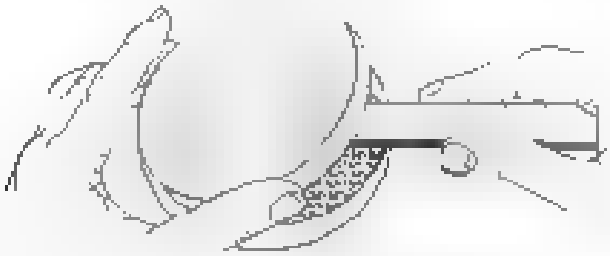


Figura 2.8 Técnica de Pour Plate. (Figura adaptada de Microbiologia Ilustrada, Prescott, Harley, Klein, 5ª ed., Cappuccino/Sherman, 6ª ed. Amanco, Guanabara Koogan, 2000.)

2.6 – Culturas puras

A partir de uma mistura de organismos podemos preparar culturas puras, desde que utilizemos técnicas adequadas.

Para obtermos culturas puras de uma determinada espécie ou linhagem a partir de uma mistura de organismos, temos que usar procedimentos que envolvem técnicas de isolamento. O exemplo a seguir descreve e ilustra a situação presente pelo isolamento de *E. coli* a partir de uma amostra de água de esgoto (normalmente o esgoto possui uma variedade de microrganismos entéricos e não-entéricos).

Inicialmente uma alíquota da água de esgoto é semeada em estrias na superfície de uma placa contendo ágar Mac Conkey (ver Fig. 2.6, item 2.5.3). A seguir a placa é incubada por 18-24 horas a 37°C. As placas devem ser incubadas na forma invertida, para que as gotas de água geradas durante a incubação não pinguem sobre o meio de cultura, prejudicando o isolamento. Durante a incubação, as células que estão separadas e que forem capazes de crescer nesse meio de cultura originarão colônias individuais. Após 24 horas em ágar Mac Conkey, células de *E. coli* dão origem a colônias vermelhas, com aproximadamente 2–3mm de diâmetro. Todavia, nem todas as colônias com esta aparência serão obrigatoriamente de *E. coli*. O próximo passo é escolher algumas dessas colônias para exame mais detalhado. Como *E. coli* é bastante comum nesse tipo de material, é provável que algumas dessas colônias pertençam a bactérias do gênero *Shigella*. Antes de

[illegible]

para a identificação dos microrganismos

2.7 Meios de cultura e condições de incubação para anaeróbios

Para que ocorra a multiplicação dos microrganismos anaeróbios os meios inoculados devem ser incubados em condições apropriadas

2.7.1 – Incubação anaeróbia em jarras

[illegible]

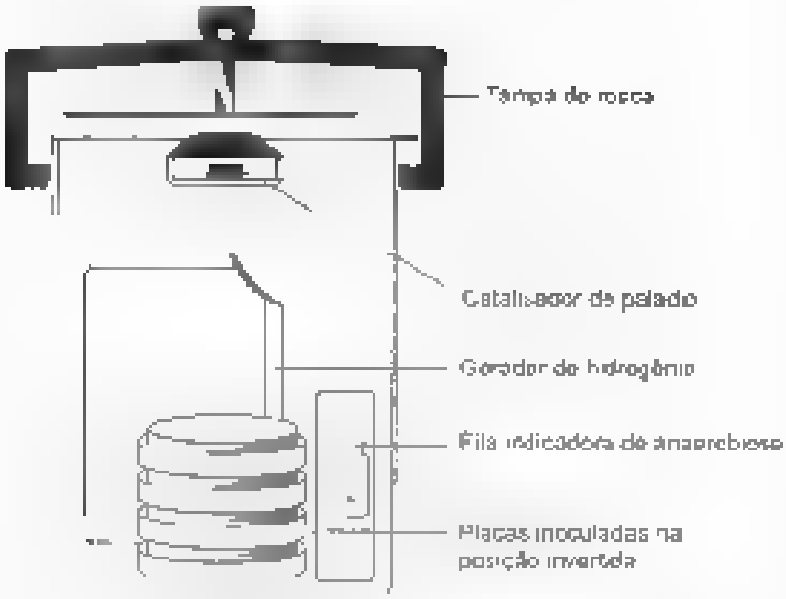


Figura 2.9 Jarra para o cultivo de microrganismos anaeróbios

2.7.2 Meios de cultura para anaeróbios

A maior parte dos microrganismos anaeróbios podem crescer em meios de cultura apropriados, como é o caso do meio de Robertson (carne de coração picada 100g/L, peptona 10g/L, cloreto de sódio 05g/L e um agente redutor, por exemplo, cisteína ou tioglicolato). O meio é esterilizado por autoclavação e mantido em frascos com tampa de rosca.

2.7.3 Câmaras para o trabalho com anaeróbios

A utilização de câmaras para o trabalho com microrganismos anaeróbios permite que amostras de culturas sejam retiradas em condições controladas de ausência de oxigênio, temperatura, umidade e CO_2. A manipulação das amostras no interior da câmara é feita com o auxílio de luvas fixadas no painel frontal.

2.8 – Métodos utilizados para quantificar os microrganismos

Existem vários métodos a serem utilizados quando queremos saber o número de microrganismos em uma cultura ou suspensão.

2.8 – Técnicas de diluição

O número de microrganismos em uma população pode variar dentro de uma ampla escala. Como consequência, muitas vezes torna-se impossível a quantificação de uma população de microrganismos, tanto por contagem dire

em câmaras, como por sementeira em meio de cultura sólido, métodos descritos posteriormente. Para reduzir o número de microrganismos em uma amostra, usamos as técnicas de diluição. Estas consistem em pipetar uma fração da amostra em tubo contendo outro líquido (diluente), geralmente água destilada esterilizada ou solução salina isotónica (NaCl 8,5 g/L) esterilizadas. O fator de diluição é o fator de divisão do volume inicial da amostra pelo volume após mistura da mesma com o diluente.

Assim,

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{Volume da amostra}}{\text{Volume total (amostra + diluente)}}$$

Exemplo: 1,0 mL de uma cultura de bactérias é pipetado em 9,0 mL de solução salina (NaCl 8,5 g/L). O fator de diluição nesse caso pode ser identificado por 1/10 ou 10^{-1}. Se 1,0 mL da diluição 10^{-1} for pipetado em outro tubo contendo 9,0 mL de solução salina, o novo fator de diluição a partir da amostra inicial será 1/100 ou 1/10 × 1/10 ou 10^{-2} (Fig. 2.17a).

2.8.2 Contagem do número total de células (vivas e mortas)

O número total de células é usualmente determinado por contagem em câmaras calibradas observadas com microscópio ou por "contadores" (Coulter counter), onde os organismos são contados eletronicamente. As contagens em câmaras são menos precisas, porém mais simples e mais baratas que as contagens eletrónicas. Outros métodos, como a contagem em esfregaços corados (Gram, metina), também podem ser utilizados para a obtenção do número total de microrganismos. Ressaltamos que os métodos de contagem do número total de células envolvem a contagem de células vivas e mortas. Em amostras líquidas, essas contagens são expressas em número de células/mL.

2.8.2.1 Câmaras de contagem

Para a contagem em câmaras, os organismos patogénicos ou não são depositados previamente fixados pelo calor ou por ação de uma solução corante (por exemplo, solução corante de Gram, 0,5 % cristal violeta).

Uma das fontes de erro desse tipo de contagem está relacionada com a adesão dos microrganismos à pipeta de vidro ou de plástico ou à sua aglutinação em líquidos acidos. Essas dificuldades podem ser evitadas se se preparar os organismos em solução salina contendo 0,1 % de Tween 80 ou outro detergente iónico (por exemplo, o Teepol) tamponado com No. IPO a pH 7,5. Para evitar a contaminação da suspensão por outros microrganismos não desejados, pode-se acrescentar formalina. Recomenda-se a lavagem da câmara imediatamente após o uso, para evitar a secagem do material no vidro e posterior interferência com novas contagens. A Fig. 2.10 apresenta um esquema de uma câmara de contagem típica.

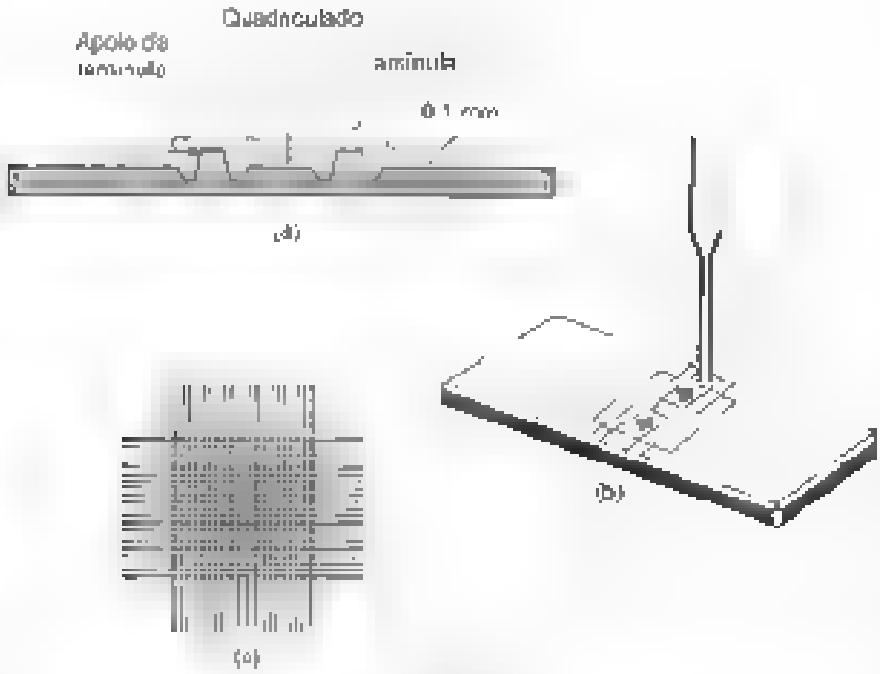


Figura 2.10 [illegible] Fonte de Paul Singleton. Ed. John Wiley & Sons, 4.ª ed. 1997

A utilização da câmara com os padrões apresentados na Fig. 2.10 deve ser feita conforme os procedimentos. Uma pipeta Pasteur contendo um pequeno volume da suspensão de microrganismos (coluna de líquido com não mais que 10 mm) é colocada como indicado na Fig. 2.10b. A ponta da pipeta deve se apoiar na placa plana central e o lado da pipeta encostar na lamínula. Com a pipeta nessa posição o líquido é automaticamente conduzido por capilaridade para dentro do espaço coberto pela lamínula e parte do espaço da placa plana. É importante que o líquido não extravase. Algumas vezes é necessário bater levemente na ponta da pipeta para que o líquido comece a sair. Após 30 minutos de repouso a contagem pode ser feita em microscópio. O cálculo do número total de partículas pode ser obtido em celulas/unidade de volume. Um exemplo prático: cada pequeno quadrado do quadriculado mede 1/400 mm². Como a distância entre a grade e a lamínula é 1/10 mm, o volume do líquido em cada quadrado pequeno é 1/4.000 mm³ (ou 1/4.000.000 mL). Suponhamos, por exemplo, que após contagem de 400 quadrados pequenos foram contadas 500 células, isto dará uma média de 500/400 = 1,25 células/quadrado pequeno, ou seja, 1,25 células por 1/4.000.000 mL. A amostra continha então 1,25 x 4.000.000 células/mL, ou seja, 5x10⁶ células/mL. A média

de várias contagens representa o resultado. Se a amostra, por estar muito concentrada, for diluída antes de ser examinada, o fator de diluição deve ser considerado no resultado final. Assim, se for feita a diluição de 1:10, a contagem deve ser multiplicada por 10.

2.8.1.2 Contagem em Coulter counter

O Coulter counter é composto por duas câmaras, um sistema de detecção de partículas e um analisador (Fig. 2.11). Para serem contadas, as partículas ou células, no caso, devem ser suspensas em um fluido condutor que passa de uma câmara para outra através de uma abertura minúscula por onde passa também uma corrente elétrica. Cada vez que uma bactéria ou qualquer outra partícula passa pelo orifício, instantaneamente muda a resistência do sistema. Essa mudança é detectada e medida por eletrodos contidos nas duas câmaras. A grandeza da alteração da tensão elétrica é proporcional ao volume da partícula. Esse instrumento permite contar rapidamente um grande número de partículas diminuindo o erro de contagem.

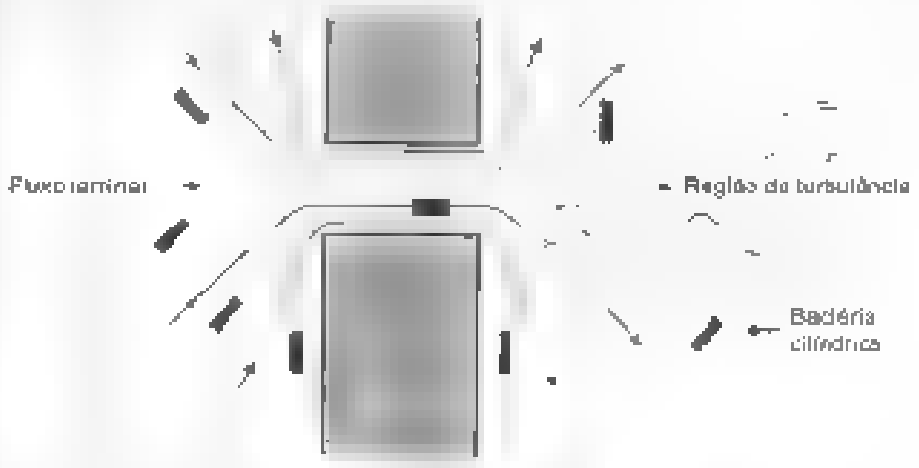


Figura 2.11 [illegible] Passagem de uma suspensão de microrganismos cilíndricos através de um [illegible]

2.8.1.3 Contagem em esfregaços corados

Neste método, uma gota de suspensão de volume conhecido (usualmente 0,01 mL) é espalhada sobre uma área de 1 cm² na superfície de uma lâmina de vidro. A seguir a gota é seca, fixada e corada. A contagem é feita ao microscópio. O número total de organismos em 0,01 mL e o número de organismos em cada campo observado, dividido pela área do campo em mm², como é esperado, os organismos não se distribuem homogeneamente na gota, permanecendo mais concentrados no centro do que nas bordas. Por esta razão, a contagem deve ser feita em toda a área da gota para a obtenção de um valor médio.

2.8 — Método da turbidimetria com padrão visual com tubos de turvação padrão

O número total de microrganismos em uma amostra pode ser estimado por turbidimetria. Nesse método, a turvação de uma suspensão de microrganismos é comparada com tubos contendo concentrações crescentes de sulfato de bário (Tab. 2.2 — Escala de Mac Farland). A turvação dos tubos varia de transparente (tubo 1) a translúcido, o turvo, almagamado e opaco (tubo 10). Para um determinado microrganismo (geralmente bactérias ou leveduras), a turvação apresentada em um tubo corresponde à turvação de uma suspensão com um número conhecido de células. A amostra deve ser observada em tubos de dimensões iguais ao tubo contendo a suspensão padrão. A turvação da amostra é comparada visualmente com a de um determinado tubo da série padrão e o cálculo da concentração de células na amostra é feito a partir de uma tabela que acompanha o conjunto de tubos padrões.

Tabela 2.2 Preparação [illegible] de Mac Farland, [illegible] adaptada [illegible] de Approximate Bacterial [illegible]

Tubo	Cloreto de bário 1% (mL)	Ácido sulfúrico 1N em volume (mL)	Valor aproximado da concentração de bactérias (milhões/mL)
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	[illegible]	[illegible]	900
4	0,4	9,6	1200
5	0,5	9,5	1500
6	0,6	9,4	1800
7	0,7	9,3	2100
8	0,8	9	2400
9	0,9	9	2700
10	1,0	9,0	3000

2.8.1 — Contagem do número de microrganismos vivos

A contagem de leveduras mede a concentração de células vivas. Todavia, o seu significado está condicionado ao conceito do que é vivo em microbiologia. A definição mais aceita para o trabalho com microrganismos é a de propriedade *como o poder de brotar, [illegible] macroscópicas [illegible] sólido ou de formar*

[illegible]

[illegible] nos de cultura

[illegible]

(UFC)

O número de vasos pode ser estimado através da contagem de [illegible] no meio sólido ou pela medida da turvação do meio líquido

[illegible] de cultura

[illegible] eadas com diluições crescentes

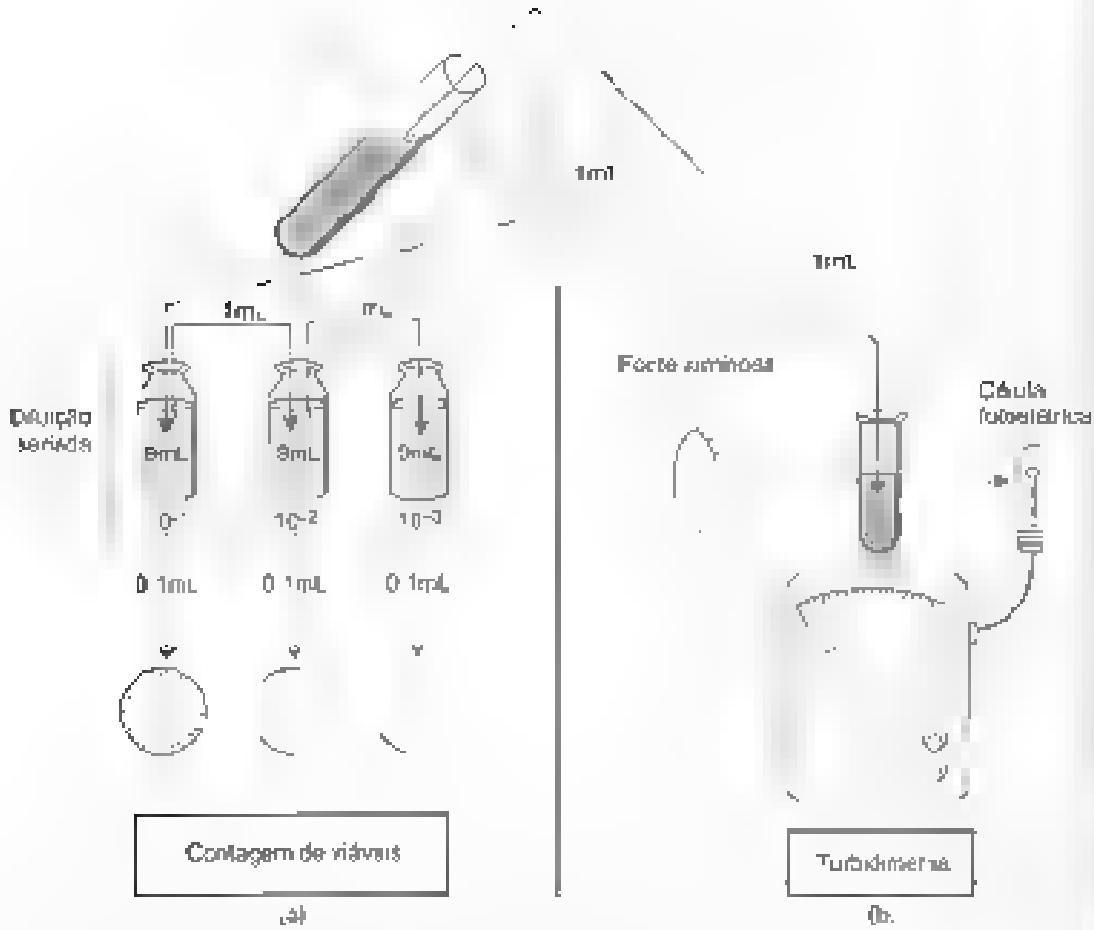


Figura 2.12 Métodos [illegible] para as [illegible] de microorganismos [illegible] (a) [illegible] (b) [illegible]

2.8.2.2 Contagem de colônias após derramamento do meio inoculado em placa. Método do "Pour Plate"

Nesse método o inóculo líquido é misturado com o ágar fundido (45°C) contido em um tubo ou frasco, que então é derramado no interior da parte baixa de uma placa de Petri estéril (ver item 2.5.3.5 – Fig 2.8). Após solidificação do meio e incubação da placa por tempo adequado, as colônias crescerão sobre e dentro do ágar, tornando possível a contagem do número total de colônias viáveis como no método anterior.

2.8.2.3 Contagem de colônias após inoculação com gotas. Método Miles e Misra

Nesse método a estimativa do número de células vivas é obtida a partir da contagem de colônias originadas pelas células contidas nas gotas. Inicialmente a amostra é diluída e uma gota de volume conhecido, proveniente de cada diluição, é pipetada em local predeterminado na superfície seca do meio de cultura sólido. As placas são mantidas em repouso até secagem das gotas e a seguir invertidas e incubadas em temperatura adequada até o crescimen-

to visível das colônias. As gotas que contêm um número grande de células apresentarão crescimento, porém, pela proximidade das células, estas não originarão colônias isoladas, inviabilizando assim a sua contagem. Qualquer gota contendo menos de 15 células vivas dará origem a um número de colônias contáveis. Nesse método o tempo de incubação é crítico, uma vez que as colônias podem se fundir rapidamente, inviabilizando a contagem. Considerando, como nos demais métodos, que cada célula originou uma colônia, a contagem do número total de viáveis na amostra pode ser feita considerando: 1. Número de colônias; 2. Volume da gota; 3. Fator de diluição. A mesma pipeta pode ser usada para todas as diluições, desde que o início seja a partir da maior diluição (Fig. 2.13).

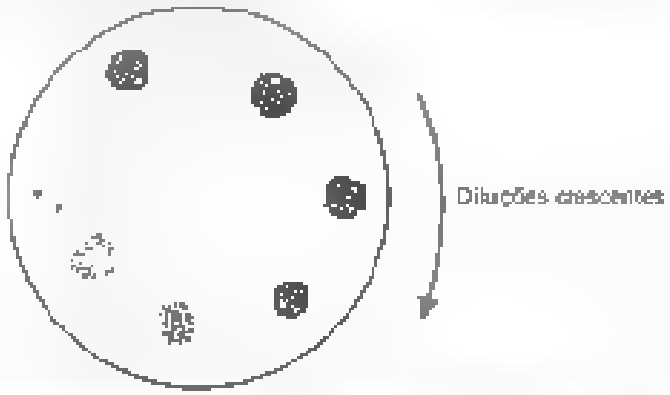


Figura 2.13 – Método de gotas de Miles e Misra. As gotas devem ser colocadas em ordem crescente de diluição, para evitar contaminação cruzada, como a presença de gotas provenientes de diluições maiores.

2.8.2.4 – Contagem de colônias após filtração

Esse método é utilizado para amostras com uma baixa concentração de microrganismos. Por exemplo, a água de um rio limpo. Após passagem de determinado volume (10 ml) por membranas filtrantes (Fig. 2.14) com poros de 0,45 µm de diâmetro, os filtros com os microrganismos retidos são colocados na superfície de meios de cultura sólidos apropriados e incubados em temperatura adequada. Durante a incubação, os nutrientes contidos no meio de cultura difundem através da membrana e sobre ela formam-se colônias a partir das células retidas no filtro. A contagem do número de células viáveis é feita a partir das colônias crescidas na membrana e o volume da amostra filtrada.

2.8.2.5 – Determinação do número de viáveis após inoculação em meio líquido: Método do Número Mais Provável (N.M.P.)

Nesse método a cultura ou suspensão contendo os microrganismos é diluída várias vezes, como nos métodos de sedimentação em meio de cultura sólido. A seguir, inocula-se em uma série de 3, 5 ou 10 tubos um volume conhecido de cada diluição. Após a incubação, anota-se o número de tubos que apresentam crescimento (cresce o meio) ou não para cada diluição inoculada. Os meios inoculados a partir de suspensões concentradas devem apresentar turvação em todos

os tubos. Os meios inoculados a partir de diluições maiores não apresentarão crescimento, ou seja, não estarão turvos. O método das diluições sucessivas tem como princípio que os meios que permanecem claros, sem crescimento visível, após incubação, estão isentos de qualquer organismo vivo. Os tubos contendo meios inoculados com diluições intermediárias apresentarão turvação em apenas alguns tubos e em outros não. A proporção de tubos turvos e não turvos em cada diluição inoculada está relacionada com o número de organismos viáveis na suspensão original e é considerado o Número Mais Provável (NMP) de organismos. O cálculo é obtido a partir dos resultados obtidos na prática recorrendo-se a tabelas adequadas.

Tabela 2.8.6 — Determinação do número de microorganismos ocupando um nível de altura (Método do Número Mais Provável alternativo NMPA)

Esse método é uma adaptação do método anteriormente usado para estimar o NMP de microorganismos em meio líquido. Nesse método, o meio, após os tubos contendo meio líquido são substituídos por espaços predeterminados na superfície de um meio de cultura sólido. A partir de diluições da suspensão original gotas de volume conhecido, geralmente de 5 a 10 µL, são pipetadas nos espaços delimitados na superfície do meio, conforme modelo mostrado na Fig. 2.4.

Após sedimentação das gotas, o meio é incubado em condições adequadas até o aparecimento de colônias visíveis. Nesse método, diferente do método das gotas, as colônias não são contadas mas, que é considerado é o número de espaços inoculados a partir de cada diluição que apresente qualquer tipo de crescimento. A partir dos resultados escolhe-se 3 diluições para o cálculo do número mais provável de microorganismos viáveis na amostra. Como no método anterior, o cálculo é obtido a partir dos resultados experimentais recorrendo-se a tabelas adequadas.

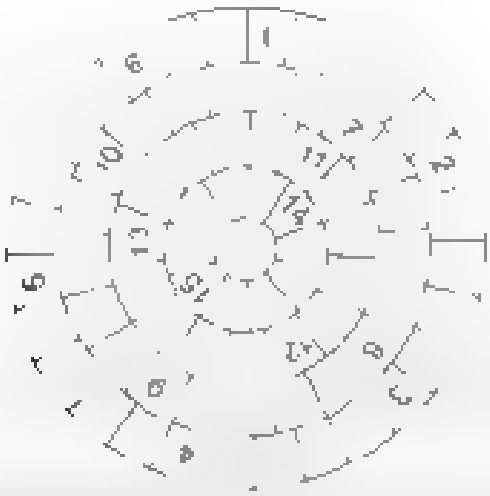


Figura 2.14 — [illegible]

[illegible]

2.8.3 [illegible]

2.8.3.1 – Determinação da massa de material celular

[illegible]

2.8.3.2 – Turbidimetria com espectrofotômetro

[illegible]

[illegible]

2.8.3 Dosagem de componentes celulares

[illegible]

[illegible]

[illegible]

2.9 Coloração de microrganismos

2.9.1 Preparação de esfregaços e fixação pelo calor

Para que uma amostra seja corada, geralmente as células são previamente mortas e fixadas. Os esfregaços devem ser feitos sobre uma lâmina de vidro. Conforme esquema na Fig. 2.15, descreveremos a seqüência dos procedimentos a serem executados na preparação de um esfregaço: (a) Colocar sobre uma lâmina de vidro limpa e seca uma gota de água. (b) Emulsificar na gota os microrganismos aderidos na alça, provenientes de cultura em meio sólido. Se o inóculo for uma suspensão, não há necessidade de colocar previamente a gota de água. (c) e (d) Espalhar o inóculo na gota, de maneira a formar uma película fina sobre a lâmina. (e) Deixar secar em temperatura ambiente. Não secar diretamente na chama, para não modificar a morfologia dos microrganismos. (f) Fixar o material passando rapidamente a lâmina 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen. Deixar esfriar antes da coloração.

Esse é o método mais simples para a preparação e fixação do esfregaço, após coloração, e pode será ser examinado em microscópio óptico.

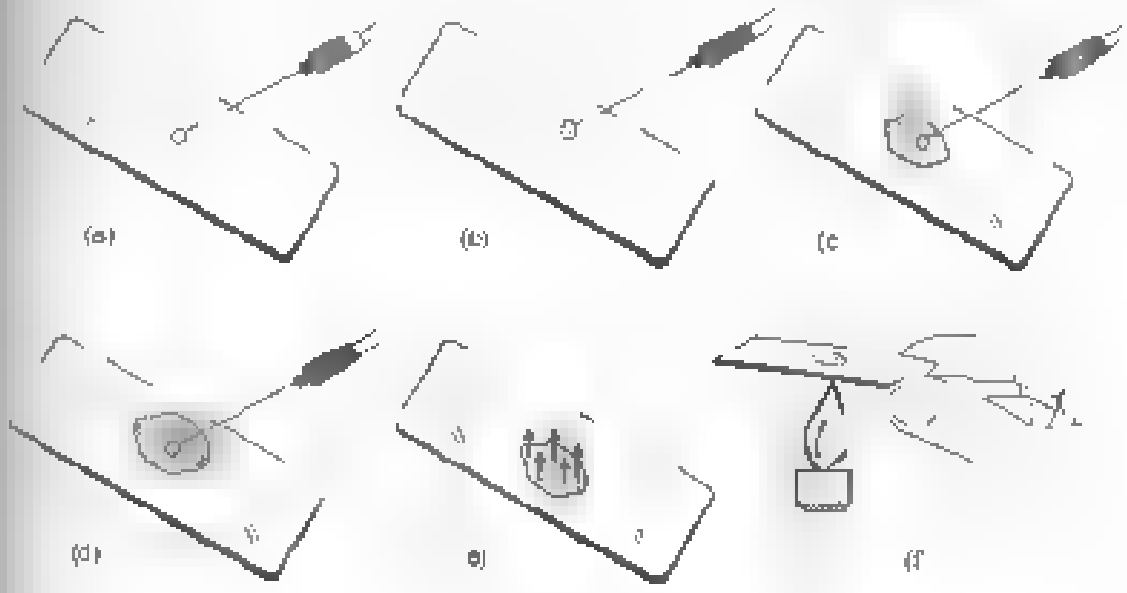


Figura 2.15 Preparação de um esfregaço e sua fixação pelo calor

2.9.2 Coloração de Gram

Essa coloração é utilizada para separar as bactérias em dois grandes grupos: bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas. As etapas da coloração de gram encontram-se descritas na legenda da Fig. 2.16.

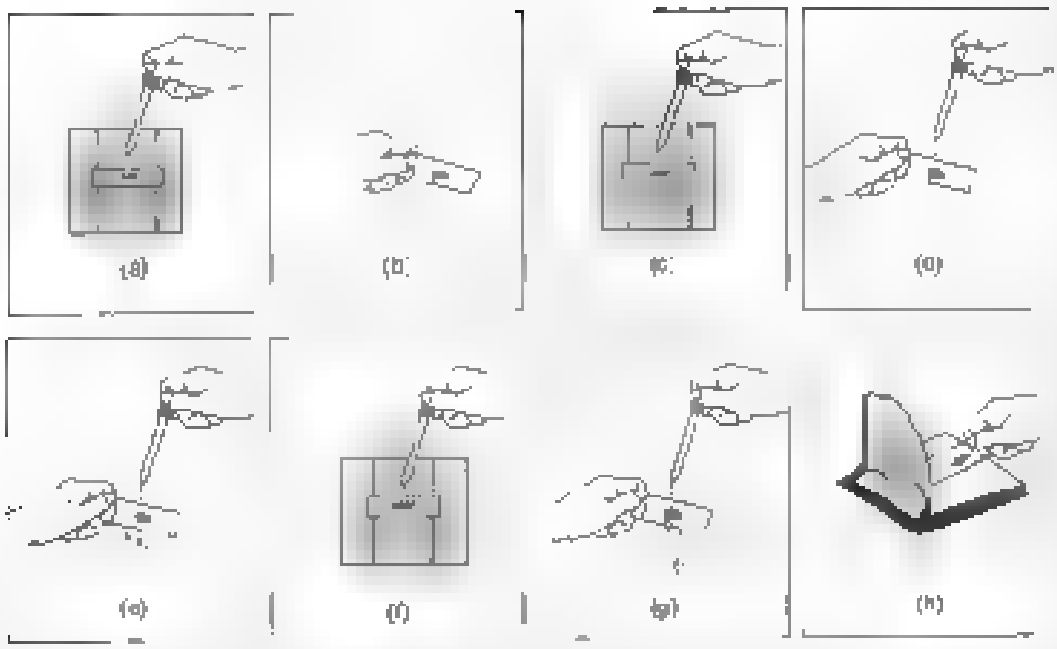


Figura 2.16 – Etapas da coloração de gram: [illegible] esfregaço [illegible] derramar o cristal-violeta [illegible] [illegible] iodo [illegible] de potássio [illegible] preparação [illegible] [illegible] esfregaço em água corrente [illegible] Nessa etapa as células gram-negativas [illegible] gram-positivas [illegible] esfregaço [illegible] observar a preparação em microscópio com objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes).

Referências bibliográficas

1. MEYNELL, G.G. ET MEYNELL, E. **Theory and Practice in Experimental Bacteriology**. 2 ed. Inglaterra: Cambridge University Press, 1970.

2. CARVALHAL, M.L.C.; OLIVEIRA, M.S. ET ALTERTHUM, F. An economical and time saving alternative to the most-probable-number method for the enumeration of microorganisms. **J. Microbiol. Meth.**, vol.14, p.165-170, 1991.

3. TAYLOR, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series. **J. Appl. Bacteriol.**, vol.25, p.54-61, 1962.

4. NORRIS, J.R. ET RIBBONS, D.W. (eds.) **Methods in Microbiology**. vol.1. Academic Press, Londres, 1969.

5. GERHARDT, P. (EDITOR IN CHIEF); MURRAY, R.G.E.; COSTILOW, R.N.; NESTER, E.W.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. ET PHILLIPS, G.B. **Manual of Methods for General Bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington, 1981.

Leitura complementar

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. ET RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, vol.193, p.265-275, 1951.

STEKJS. P.E. **Investigating Microbiology – A Laboratory Manual for General Microbiology**. Saunders College Publishing. ELA. 1997

MILES. A.A. ET MISRA. S.S. "The estimation of the bactericidal power of the blood". **J. Hyg. Camb.** vol 38, p. 732 – 742, 1938.

HUBEN. H. ET SOMASEKARAN. P. "Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp." **Appl. Environ. Microbiol.** vol.44, p.1246 – 1247 1982

3 ELEMENTOS DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

João Lucio de Azevedo

3.1 Introdução

A Genética é uma das mais recentes áreas das Ciências Biológicas que [illegible] ra bem geral pode ser definida como o estudo da transmissão [illegible] características de ascendentes para descendentes. Essas características chamadas de hereditárias são transmitidas de modo ordenado em todos os seres vivos. A Genética procura também explicar como ocorre a enorme variabilidade que pode ser observada entre e dentro das espécies.

Sendo o material genético [illegible] dos seres vivos, constituído pelo ácido desoxirribonucleico ou DNA, a Genética possui suas regras válidas tanto para plantas e animais superiores como aos microrganismos. É no DNA que estão as informações genéticas necessárias para a manutenção e sobrevivência das espécies. As leis fundamentais da Genética foram descritas pela primeira vez na segunda metade do século passado, em ervilhas. Entretanto a redescoberta dessas leis em 1900 e as plantas e animais serem amplamente usados em pesquisas genéticas, a introdução de microrganismos [illegible] no impulso à ciência da hereditariedade foi apenas em 194[illegible] que [illegible] efetivamente introduzidos em estudos genéticos, seguindo-se [illegible] vírus, além de algas e protozoários.

Essa introdução foi um marco decisivo para o desenvolvimento da Genética, uma vez que microrganismos possuem quantidades quase que ideais [illegible] tipo de estudo. Eles apresentam, de modo geral, um ciclo vital rapido [illegible] estudo da herança [illegible] hereditárias em um período de tempo [illegible] microscópicos, eles podem ser cultivados em grande número, requerendo pouco espaço e portanto com economia, propiciando que características raras possam ser detectadas em grandes populações.

3.2 – Mutação

s de mutações que ocorrem em seres vivos

A. Mutações ou alterações cromossômicas

Numéricas

	Número de cromossomos			
Haploidia	[illegible]	[illegible]		
Diploidia	[illegible]	[illegible]		
Triploidia	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Tetraploidia	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Diploidia	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Trissomia	[illegible]			
Dupla trissomia	[illegible]	[illegible]		
Monossomia	[illegible]	[illegible]		

B. Estruturais

	Estrutura dos cromossomos (letras = regiões cromossômicas)			
Função normal	a b c	d e	g h	k
Deleções (terminais)	a b	d e f	g	k
Deleções (intersticial)	a b c	d e	g	
Duplicação (em tandem)	a b c	d e	g	c b a f
Duplicação (não tandem)	a b c	d e c	g c	c b f b
Inversão	a b c	d e	g	b c
Translocação (recíproca)	a b c	d e	g h	k

B. Mutações gênicas ou de ponto

1) Substituição de nucleotídeos

transição

transversão

4. Adições ou perdas de um ou poucos nucleotídeos

ATCGAATC (Adição ou +) ATTCGAATAC

ATCGAATT (Perda ou −) ATCGAAC

Figura 3.1 Diferentes tipos de mutações: [illegible] Exemplos de mutações cromossômicas e gênicas.

em seguida.

de microrganismos

3.2.2 Mutantes auxotróficos

[illegible] *lysA2*, *lysA3* etc.,

[illegible]

[illegible] em genética microbiana

3.2.2.3 Mutantes resistentes a agentes inibidores

[illegible] temperaturas, vírus, etc

3.2.2.4 Mutantes morfológicos

[illegible]

[illegible]

[illegible]

3.2.2.6 Mutantes para virulência e patogenicidade

[illegible] es em causar morte de seus hospedeiros

[illegible]

coleta solar

3.2.2.8 Reversões

[illegible]

3.2.2.9 Outros tipos de mutante

[illegible]

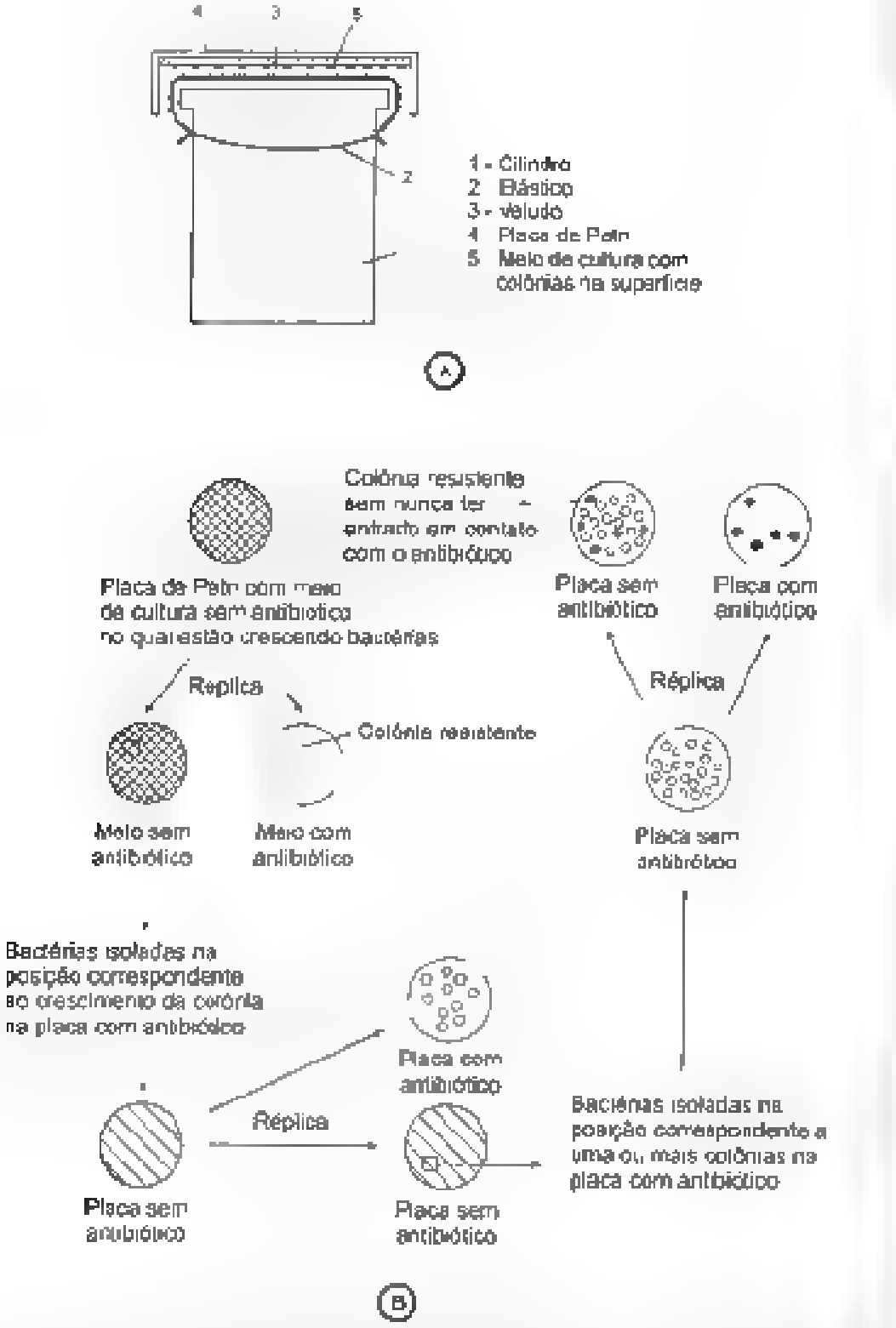


Figura 3.2 – Técnica da réplica para transferência de bactérias. A) A transferência de colônias da placa para o veludo. B) Aplicação da técnica no isolamento de bactérias resistentes a um antibiótico, mostrando que a mutação para resistência ocorre previamente ao contato com a droga.

é usado em casos com resistência poligênica, isto é, quando vários genes estão envolvidos, cada um conferindo uma pequena resistência. Nesses casos, utiliza-se a placa gradiente (Fig. 3.3), que faz com que um meio de cultura apresente um gradiente de concentrações de zero até um limite máximo.

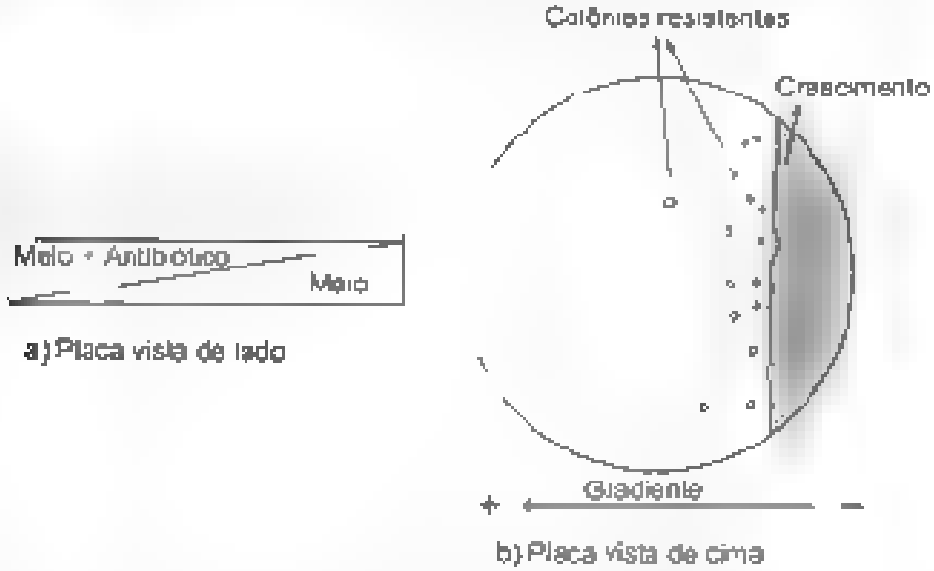


Figura 3.3 Placa gradiente para o isolamento de microrganismos resistentes a certos antibióticos.

Dessa maneira linhagens com genes cromossômicos para alta resistência a penicilinas, cloranfenicol, tetraciclinas e outros antibióticos puderam ser isoladas (para uma revisão ver 14). O isolamento de mutantes morfológicos é feito por inspeção visual, não existindo praticamente uma maneira de se fazer um enriquecimento prévio. O importante no caso é ter em mente que alterações do ambiente podem também alterar a morfologia de colônias microbianas. Assim, o isolamento tem que ser feito em condições bem controladas. Há necessidade de vários repiques de colônias com morfologia alterada para verificar se a característica é realmente genética e não devido a modificações no ambiente.

Mutantes para maior ou menor produção de substâncias eliminadas das células microbianas para o meio de cultivo, são também isolados em meios que permitam essa distinção. Para o isolamento de mutantes com produção alterada de um antibiótico, por exemplo, colônias podem ser desenvolvidas em meio sólido e depois colocadas em presença de um microrganismo sensível. Evidentemente esse microrganismo não poderá crescer ao redor de colônias produtoras e quanto maior o halo de inibição formado ao redor da colônia, maior deve ter sido a produção de antibiótico pela mesma. De igual forma, o isolamento de um microrganismo com mais alta ou mais baixa produção de uma enzima do que a linhagem original pode ser feita em meio apropriado. Para amilases pode-se usar meio com amido e verificar a presença de halos e seu alargamento usando-se uma solução de iodo que vai colorir de

[illegible] tro da genética microbiana.

3.2.4 A natureza da variação microbiana

[illegible] rísticas genéticas determinadas.

[illegible] pelo agente em questão.

3.3 – Recombinação em microrganismos

[illegible]

[illegible] guar descritos

3.3.1 Recombinação em bactérias

[illegible]

3.3.1.1 A conjugação bacteriana

[illegible]

como do tubo em U mostrou que havia necessidade de um íntimo contato entre as células das duas linhagens originais para que recombinantes prototróficos aparecessem (Fig. 3.4).

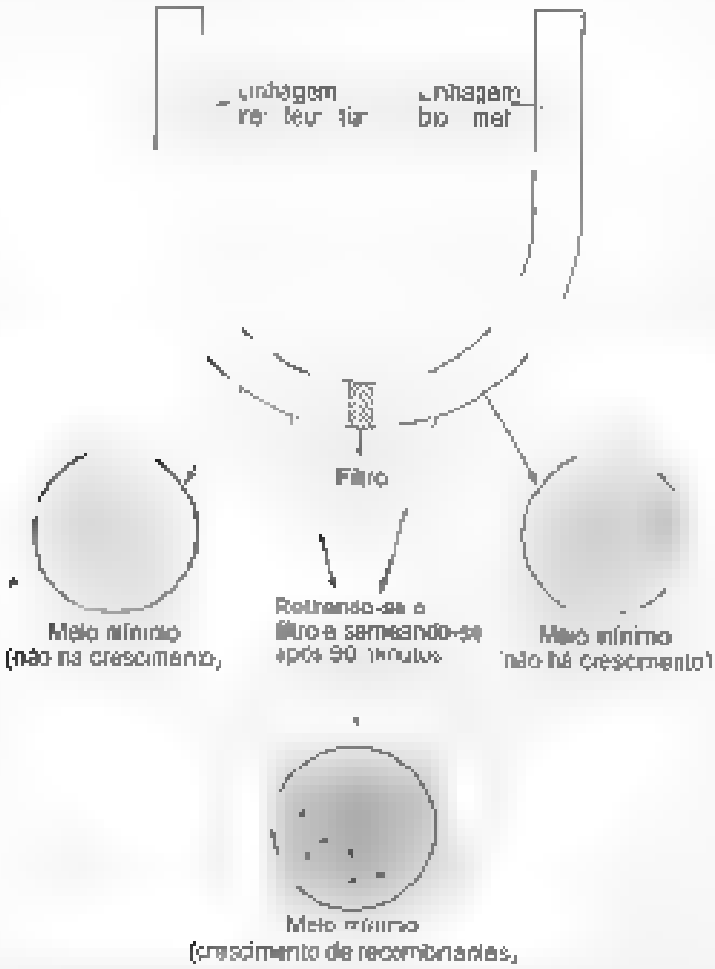


Figura 3.4 De [illegible] células por conjugação com mutantes auxotróficos deficientes para as rotas de biossíntese [illegible] Meio mínimo [illegible] crescendo [illegible]

O próximo passo foi demonstrar que existiam tipos de reações sexuais ou "sexos" diferentes em bacterias. Hayes em 1952 [illegible] cruzamentos recíprocos, empregando duas linhagens com deficiências auxotróficas distintas e uma delas sendo resistente ao antibiótico estreptomicina. Foi verificado que recombinantes só apareciam em meio com estreptomicina quando uma linhagem determinada era resistente a esse antibiótico. Isso levou à conclusão de que havia células doadoras de material genético e células receptoras desse material que necessitavam permanecer vivas no meio com estreptomicina, para que a conjugação produzisse recombinantes. As células doadoras foram chamadas de F+ ou "masculinas" e as receptoras de F- ou "femininas". Aos

poucos o processo foi sendo elucidado. Verificou-se logo a seguir que células doadoras eram diferentes das receptoras, por conter além do cromossomo um elemento extracromossômico adicional, designado de plasmídeo F (de fertilidade). Por outro lado, células receptoras não continham o plasmídeo F. Mais tarde foi também visto que o plasmídeo F, possivelmente de origem viral, possuía tamanho bem menor que o cromossomo bacteriano, mas era capaz de conter genes suficientes para sua duplicação autônoma, isto é, independente da do cromossomo da célula, além de possuir genes para sua transferência de uma célula para outra. Entre esses genes existem aqueles carregando informações genéticas para a síntese de fímbrias ou pili sexuais, que permitem com que o contato entre células doadoras e receptoras ocorrasse e que o material genético passasse de uma célula para outra. Foi verificado também que pela conjugação bacteriana apenas o plasmídeo F pode ser transferido após sua duplicação na célula doadora (Fig. 3.5).

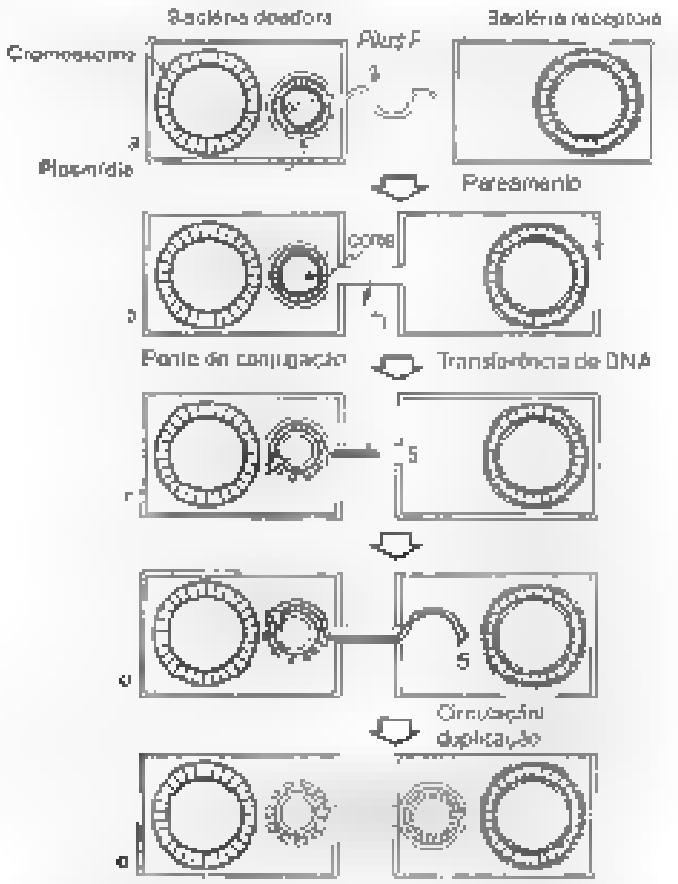


Figura 3.5 Conjugação em bactérias. (a) Presença do plasmídeo F na célula doadora F+ e ausência na célula receptora F-. (b) Pareamento, formação do pilus sexual e início da conjugação. (c) Formação da ponte de conjugação e início da transferência de cópias do DNA do plasmídeo da célula doadora para a receptora. (d) Circularização e duplicação do DNA no plasmídeo. (e) Término da conjugação, resultando duas células F+. (modificado de Souza)

Nesse caso, a célula receptora feminina não recebe genes cromossômicos, mas apenas muda de sexo. Por outro lado, a célula doadora pode também mudar de seu estado F+ para F− se perder o plasmídio. Isso ocorre quando ele se duplica mais lentamente que a célula que o alberga, ou quando a bactéria é tratada por certos agentes como corantes de acridina. Esses corantes são chamados de "curagênicos", pois o processo de perda do plasmídeo é designado de "cura". Mas nem sempre pela conjugação bacteriana só passa o plasmídeo F de uma célula para outra. Esse plasmídeo tem a propriedade de poder inserir-se no cromossomo da célula doadora. Nesse caso, ele pode transferir parte do cromossomo ou todo o cromossomo para a célula receptora (Fig. 3.6).

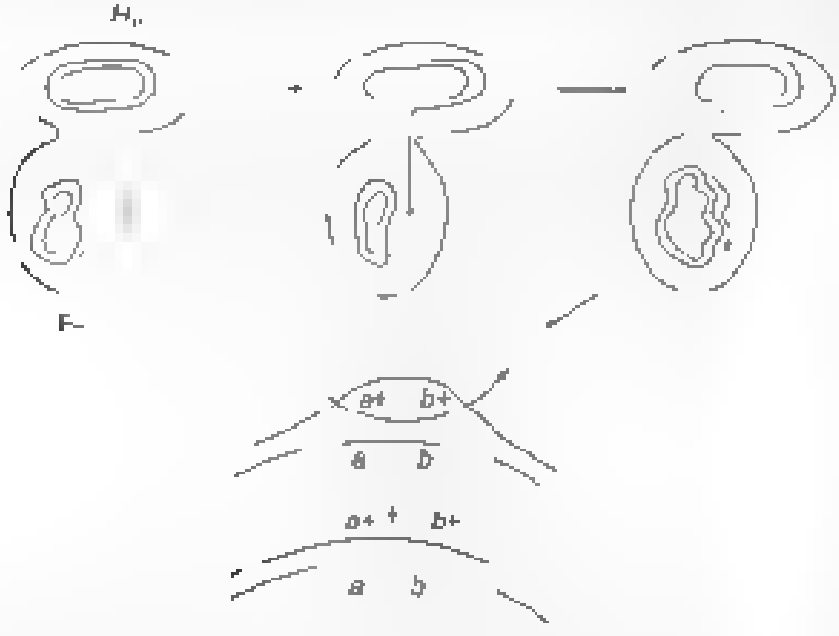


Figura 3.6 Conjugação bacteriana. Célula H+. Transferência do cromossomo de célula H+ para células F−. Os genes a e b recombinam-se quando ocorrem cruzamentos. (Modificado de Tamarozzi et al.).

As células que têm o plasmídeo ligado ao cromossomo bacteriano são chamadas de Hfr, de High Frequency of Recombination, e são elas que transferem genes cromossômicos de bactérias doadoras para receptoras, como ocorreu no experimento original da descoberta do processo de conjugação em *E. coli*. Ainda outra variação do mecanismo pode ocorrer. O plasmídeo F, inserido em células Hfr, tem a capacidade de poder voltar ao seu estado autônomo. Nesse caso, raramente ele pode levar algum gene cromossômico quando se desliga do mesmo. Plasmídeos carregando um ou mais genes do cromossomo são chamados de F′ (F linha ou F primo). Quando eles passam de uma célula para outra, carregam gene ou genes cromossômicos para a bactéria receptora. Esse processo é chamado de sexdução (Fig. 3.7).

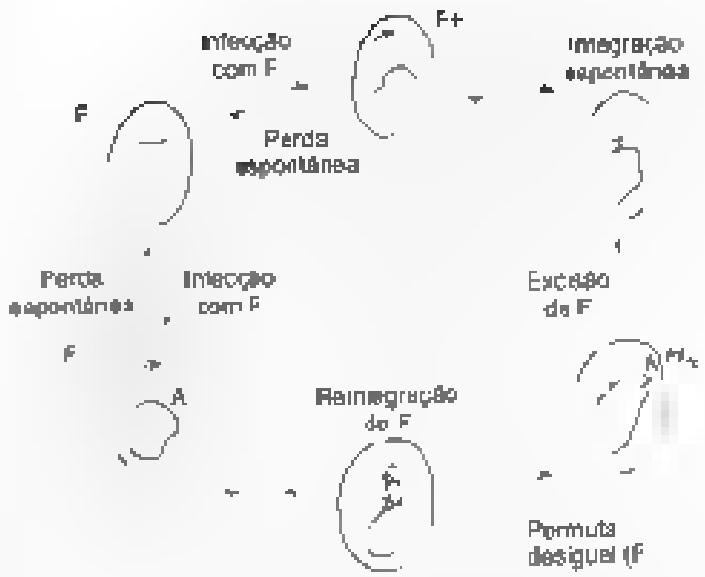


Figura 3.7 Os diferentes estados do plasmídeo F na conjugação bacteriana. Produção de plasmídeos F com transferência de um gene cromossômico A

ESTÁGIOS DA CONJUGAÇÃO - De um modo geral, em uma conjugação bacteriana os seguintes estágios podem ser distinguidos: a) Formação de pares específicos: ocorre entre células doadoras e receptoras, mas raramente também entre duas células doadoras. A formação de pares não é exatamente ao acaso, mas envolve um processo de quimiotaxia, onde há atração da célula masculina pela feminina. b) Formação de conexão celular: ocorre através do *pili* sexual (plural *pro*). c) Mobilização e transferência do cromossomo ou do plasmídeo F: no F apenas uma fita de DNA, seja do cromossomo ou do plasmídeo, é transferida. No caso de transferência do cromossomo ele quase sempre só é em parte transferido, a quebra da ponte citoplasmática entre as duas células é comum durante o processo. d) Integração do material genético na célula receptora: há pareamento de regiões homólogas da fita de DNA proveniente da célula doadora e cromossomo da célula receptora. Pelo mecanismo de permutação ou "crossing-over" vai haver então a formação de recombinantes, que podem ser isolados em meios apropriados.

AMPLITUDE DO PROCESSO DE CONJUGAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS - Além de ocorrer em *E. coli* e outras enterobacterias, a conjugação já foi descrita em muitos outros gêneros como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rh. solanacearum* e *inclusive em gêneros* de bacterias gram-positivas como *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus*, etc. Existem pequenas variações no mecanismo de acordo com a espécie, mas as características gerais da conjugação permanecem as mesmas. Cruzamentos interespecíficos são às vezes possíveis entre gêneros aparentados, como *Escherichia* e *Shigella*. *Pseudomonas* possuem plasmídeos designados de P. Alguns deles são ditos plasmídeos promíscuos, pois podem ser transferidos para gêneros bastante distintos. A descoberta dos plasmídeos P foi de

[illegible]

[illegible]

3.3 2 Transformação em bactérias

[illegible]

descendentes (Fig. 3.8

Figura 3.8

[illegible]

[illegible]

[illegible] bactérias e outros microrganismos.

3.3.1.3 Transdução

[illegible]

Ele pode ser considerado um refinamento do processo de transformação. Na transdução, bactérias são também modificadas em suas características genéticas por um DNA vindo de outras bactérias. Entretanto, nesse caso o DNA é carregado por vírus que atacam bactérias, os chamados bacteriófagos ou abreviadamente fagos. Esses fagos infectam uma determinada bactéria, usam a mesma e podem ter um segmento de DNA bacteriano substituindo seu próprio DNA, ou mesmo ter alguns genes da bactéria incorporados ao seu genoma. Assim, quando infectar uma nova bactéria, ele vai carregar esse material para a célula hospedeira, desencadeando a transdução.

OS TIPOS DE TRANSDUÇÃO. Existem basicamente três tipos distintos de transdução: generalizada, específica ou restrita e transdução abortiva. Cada um deles vai ser visto em seguida.

TRANSDUÇÃO GENERALIZADA. Se um fago usa uma célula selvagem e depois vai infectar células mutantes, dentre elas aparecem algumas contendo genes das células usadas. Em geral, cada célula é modificada apenas para uma característica genética. Isso ocorre porque, como já mencionado, quando um fago ataca uma bactéria e mata a mesma, algumas partículas virais das centenas ou milhares que são liberadas, por um erro de incorporação, possuem um pedaço do DNA do cromossomo bacteriano em lugar do DNA do próprio fago (Fig. 3.9).

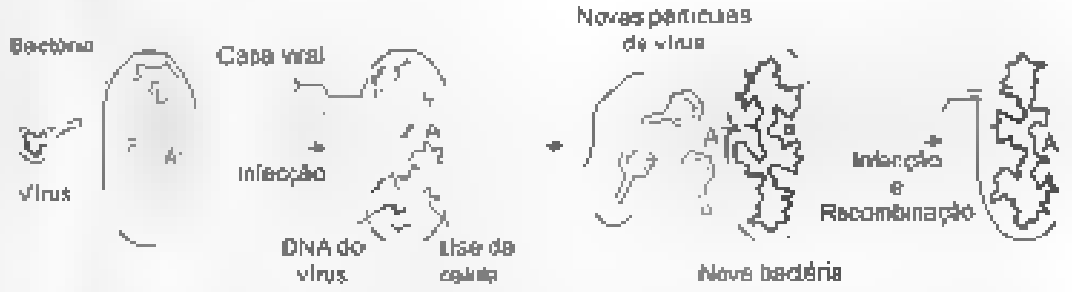


Figura 3.9 A transdução generalizada em bactérias. O gene A foi substituído por outro gene, vindo do hospedeiro receptor.

Resumindo, assim, de uma célula infectada um ou poucos fagos que contêm no interior de sua capa protéica DNA de bactéria. Isso não impede que esse fago alterado infecte uma nova célula e injete o DNA dentro da mesma. Aí, evidentemente não vai haver lise, mesmo que a célula receptora seja sensível ao fago. O DNA no interior da bactéria vai se comportar como na transformação, isto é, vai haver um pareamento entre esse segmento adicionado à célula, com o correspondente homólogo do cromossomo bacteriano, "crossing-over" e aparecimento de recombinantes. Nesse tipo de transdução, qualquer gene bacteriano pode ser carregado da célula doadora para a receptora e por isso ela é chamada de transdução generalizada. Como são muitos os fagos que infectam diferentes espécies de bactérias, o processo é de ocorrência ampla, tendo sido detectado em diferentes gêneros de bactérias, tanto gram-positivas como gram-negativas.

sos que ocorrem na transdução restrita

não incorporação

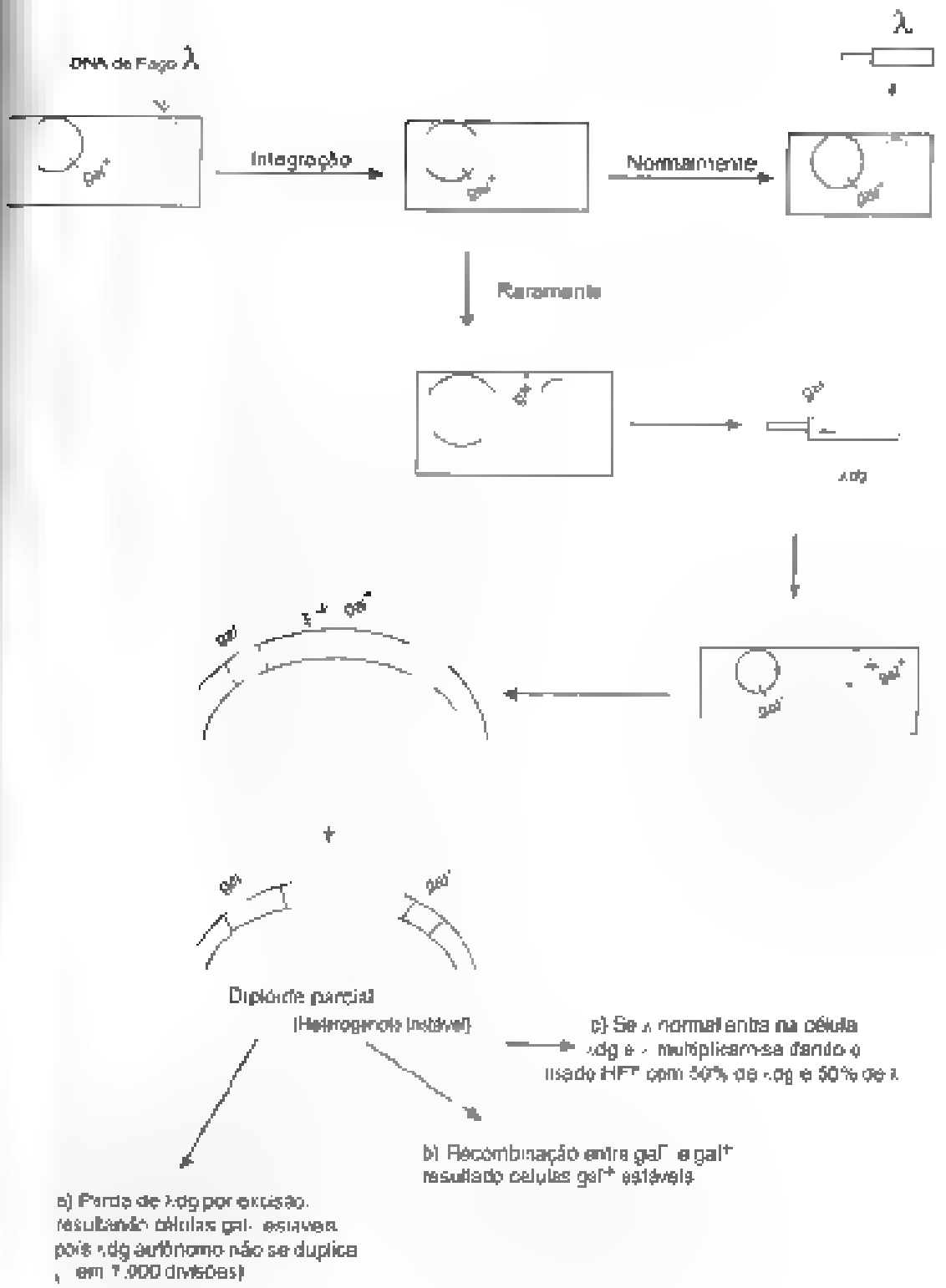


Figura 3.10 A transdução restrita em bactéria com a passagem do gene da utilização da galactose como fonte de carbono (gal)

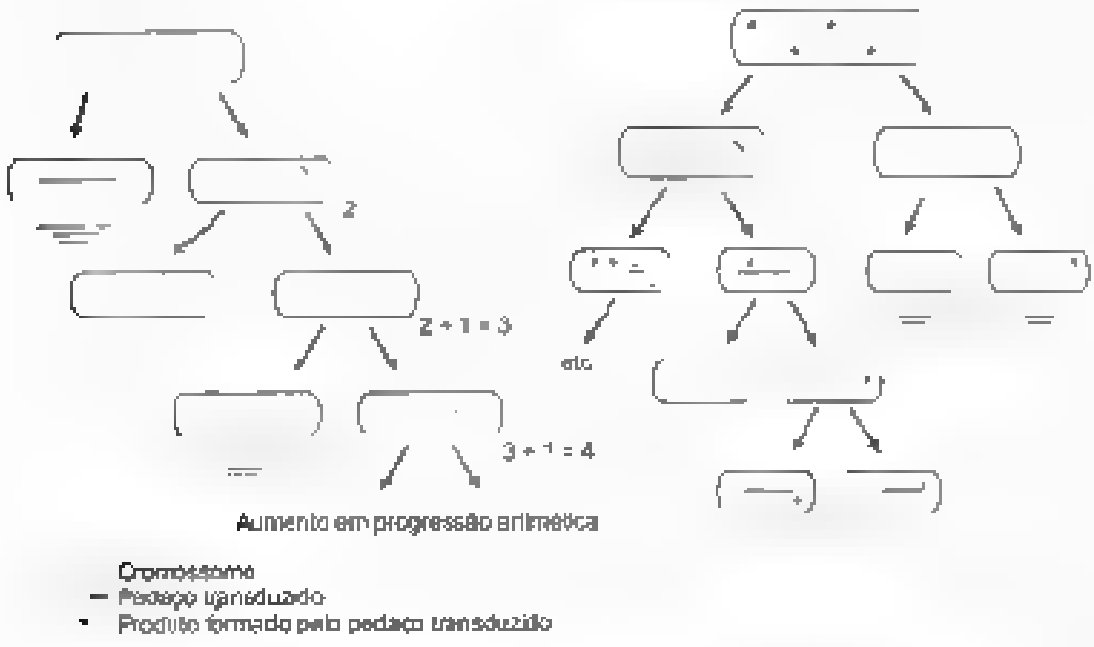


Figura 3.11 Transdução abortiva em bactéria. a) Se apenas a célula que recebe o fragmento transduzido que incorporado ao cromossomo sofre duplicação, o aumento do número de células ocorre em progressão aritmética e resulta assim uma microcolônia em meio sólido. b) Se as filhas que não recebem o fragmento transduzido também sofrem uma ou poucas duplicações, devido à existência de material endógeno, a microcolônia atinge um porte muito maior do que no caso anterior.

OS ESTÁGIOS DA TRANSDUÇÃO — A transdução pode ser dividida nos seguintes estágios: a) Formação das partículas virais transdutoras e seu transporte: o processo nos três tipos de transdução é feito pela incorporação de parte do DNA bacteriano ao do fago (transdução específica ou restrita), ou por substituição do DNA do fago por segmento de DNA bacteriano (transduções generalizada e abortiva). b) Entrada e destino do DNA dentro da bactéria receptora: a entrada é feita por injeção do DNA contido na capa protéica viral para o interior da célula receptora. Se o fragmento for incorporado ao genoma da receptora por "crossing over", ocorre a transdução por substituição como no caso da transdução generalizada. Como o DNA do fago é circular (ver Fig. 9.10), uma permuta ou "crossing-over" entre dois DNAs circulares resulta em incorporação do DNA (que foi introduzido pelo fago) sem substituição. Se o DNA não for incorporado e ficar livre na célula, ocorre a transdução abortiva.

USOS DA TRANSDUÇÃO — Como acontece no caso da conjugação e transformação, a transdução pode também ser usada como um sistema genético para mapeamento de genes bacterianos ao longo do cromossomo. Uma co-transdução, isto é, duas características frequentemente sendo transduzidas em conjunto, revela ligação dos genes envolvidos. Estudos de complementação

genes também são realizados via transdução. Bactérias, fágos e outros vírus podem também se associar à seita troca dos plasmídeos, como vetores em Engenharia Genética. Ali as [illegible] tem muito em comum: supõe-se que a origem dos plasmídeos seja [illegible]

1 [illegible] DNA [illegible]

Os três sistemas de recombinação descritos acima são artefatos de laboratório e devem ser de natureza permitida troca de material genético em bactérias. A eles podem ser adicionados mais dois sistemas, o primeiro também natural e o segundo constituindo-se muito mais em uma manipulação genética em libera-o que um sistema natural de troca de DNA entre células.

TRANSPOSONS — O genoma dos seres vivos sempre foi considerado como formado por sequências bastante estáveis, somente alteradas por mutação. Embora existissem exemplos de que o material genético poderia sofrer transposições de um ponto para outro [illegible] 2 [illegible] mesmo [illegible] essas observações consideradas [illegible] mutações. Foi preciso que processos de transposição fossem classificados do ponto de vista molecular em bactérias, para que se pudesse ser aceito depois [illegible] genetica [illegible] que [illegible] mas [illegible] de transposição [illegible] geral [illegible] um processo que aumenta a variabilidade nos seres vivos, sendo de grande importância para a evolução, regulação genética e diferenciação. Transposons foram pela primeira vez descritos do ponto de vista molecular quando se verificou que mutações clássicas polares em sistemas de regulação genética bacteriana eram causadas por segmentos de DNA inseridos em genes. Esses segmentos [illegible] sequências com um mínimo de 700 a 1.500 pares de nucleotídeos que [illegible] e [illegible] nas [illegible] de transposição. A Tabela 3 apresenta algumas propriedades de diferentes transposons.

Tabela 11 — [illegible]

Tipo de IS	Tamanhos (pares de bases)	Número de pares de bases [illegible]	Número de [illegible]
5	69	[illegible]	2
IS–4	1428	18	2
IS–5	1 95	16	4
IS- 10R	329	22	3

Logo a seguir foram descritos outros elementos transponíveis em bactérias bem maiores que os IS carregando genes [illegible] de resistência a antibióticos entre outros. Esses genes eram flanqueados por IS e [illegible] conjunto foi chamado de transposon (Tn). Atualmente, tanto IS como Tn foram a designação geral de transposons. A Fig. 3 2 mostra um desses transposons. Normal

mente uma bactéria carrega vários transposons. A linhagem de E. coli K12 possui pelo menos 14 transposons em seu cromossomo e três em seu plasmídeo F.

Figura 3.12

O MECANISMO DE TRANSPOSIÇÃO — O processo se inicia pela duplicação do elemento transponível e termina com sua inserção em outro local do genoma. A duplicação não acarreta a locomoção do transposon original, mas sim de sua cópia. Essa cópia vai alojar-se ao DNA alvo em outro local do cromossomo, ou elemento extracromossômico. Mais detalhes sobre esse mecanismo e sobre as enzimas envolvidas podem ser encontrados em revisões sobre o assunto (p. 27-28). Esse sistema, logo após sua descoberta, foi chamado de "recombinação ilegítima", pois independe das enzimas normalmente usadas para efetuar recombinação, como a através de permuta ou crossing-over. No entanto, logo ficou visto que esse é um sistema altamente regulado e altamente específico. A transposição permite que os transposons funcionem como interruptores em sistemas de regulação, permite que novas informações genéticas sejam introduzidas em uma célula e apresenta assim um potencial muito grande para aumentar a variabilidade e sobrevivência de células. Possuem também plasmídeos designados de R, semelhantes ao F, mas que carregam genes de resistência a um ou mais agentes inibidores de bactérias como antibióticos, quimioterápicos e metais pesados, foram formados por transposições de diferentes origens, selecionados em um plasmídeo único. Tal plasmídeo confere às bactérias uma vantagem seletiva na presença desses inibidores.

OUTROS EXEMPLOS DE TRANSPOSONS — Certos bacteriófagos como o Mu (Mutator) também funcionam como transposons, inserindo-se em várias regiões do cromossomo bacteriano e causando mutações. Em fungos filamentosos e leveduras também são relativamente bem descritos casos de transposons. Em leveduras variações no tipo de reação sexual (os "mating types") são causadas por transposições de material genético. Em plantas e animais superiores também transposições foram detectadas em grande número. A descoberta desse sistema de recombinação lançou novas luzes aos fenômenos ligados à alta instabilidade genética apresentada por alguns microrganismos e difícil de ser explicada pela genética até então. É o caso de variação de fase em Salmonella, tipos de reação sexual em leveduras, as habilidades de [illegible] em fun-

gos filamentosos [illegible] gens de importância industrial [illegible] apresentadas de alta resistência a vários inibidores em [illegible] as bactérias e muitas outras. Os transposons são responsáveis por uma verdadeira Engenharia Genética in vivo das células. Em alguns microrganismos que vivem dentro de plantas, sendo [illegible] parece existir uma certa coincidência de genes iguais ou semelhantes em ambos. Se confirmados esses achados estaríamos diante da possibilidade de transferência por transposição ou mecanismo similar entre genes de [illegible] de [illegible] diferentes. Essa possibilidade foi [illegible] em bactérias que causam tumores em plantas como as [illegible] que podem ter [illegible] seu plasmídio [illegible] de transferir parte do genoma da planta. Entretanto a existência de [illegible] genes entre gêneros tão [illegible] mesmo nos [illegible] pode demonstrar que a Engenharia [illegible] também na área de recombinação [illegible] seres vivos, embora ocorra com frequência reduzida.

A TÉCNICA DO DNA RECOMBINANTE — Descrita pela primeira vez em bactérias [illegible] o DNA recombinante foi amplamente [illegible] rapidamente para outros microrganismos e depois para todos os seres vivos. Hoje [illegible] desde a [illegible] sistema de recombinação [illegible] por manipulação de material genético [illegible] e introdução de genes [illegible] nas mesmas. Do ponto de vista [illegible] um sistema de recombinação que aumenta a possibilidade de [illegible] variabilidade. Do ponto de vista biotecnológico ela pode produzir substâncias de importância [illegible] Essa [illegible] será vista em detalhes em outro capítulo desta mesma publicação.

3.3.2 Recombinação em fungos

Como acontece em bactérias, a recombinação em muitas espécies de fungos pode ocorrer por todos os dois mecanismos. Sendo microrganismos eucariotos, os fungos possuem [illegible] muitas espécies apresentam um ciclo sexual similar ao das plantas superiores. Entretanto, grande parte do ciclo vital da maior [illegible] é haploide. A fase diploide é bastante rápida pois assim que [illegible] ocorre meiose [illegible] haploide. Além disso, muitos chamados Fungos Imperfeitos [illegible] não possuem ciclo sexual. Nesses fungos e mesmo em outros em que ocorre ciclo sexual existe um sistema alternativo de sexo denominado de ciclo parassexual descrito pela primeira vez por [illegible]. Também em [illegible] semelhança das bactérias a informação por DNA pode ser [illegible] sistema de recombinação. Para fungos a parassexualidade são usadas técnicas diferentes [illegible] de protoplastos. Basicamente, funciona da mesma maneira que em bactérias. A técnica do DNA recombinante pode ser usada para [illegible] os sistemas de recombinação em fungos são apresentados a seguir.

3.1.2. – O ciclo sexual em fungos

Como mencionado, os fungos são eucarióticos e muitos deles têm um processo sexual, com fusão de núcleos haplóides, produção de núcleo diplóide e meiose, resultando novamente células haplóides. Cada espécie de fungo que possui ciclo sexual apresenta características próprias nesse ciclo, mas o objetivo de sua existência é sempre o mesmo: isto é, produzir recombinantes. Alguns fungos são homotálicos, ou seja, não possuem tipos de reação sexual distintos. Nesses casos eles podem se autorecundar e recombinantes não são produzidos. Eles podem, também, sofrer cruzamento com outro tipo, produzindo recombinantes. Outros fungos são heterotálicos, com dois ou mais tipos de reação sexual ou "mating-types" distintos. Nesses casos só ocorrem cruzamentos de diferentes tipos de reação sexual é que se cruzam. As Figs. 3.12, 3.13, 3.14 e 3.15 apresentam os ciclos sexuais de três diferentes espécies de fungos, dois filamentosos, *Aspergillus nidulans* (homotálico) e *Neurospora crassa* (heterotálico) e uma levedura, a *Saccharomyces cerevisiae*.

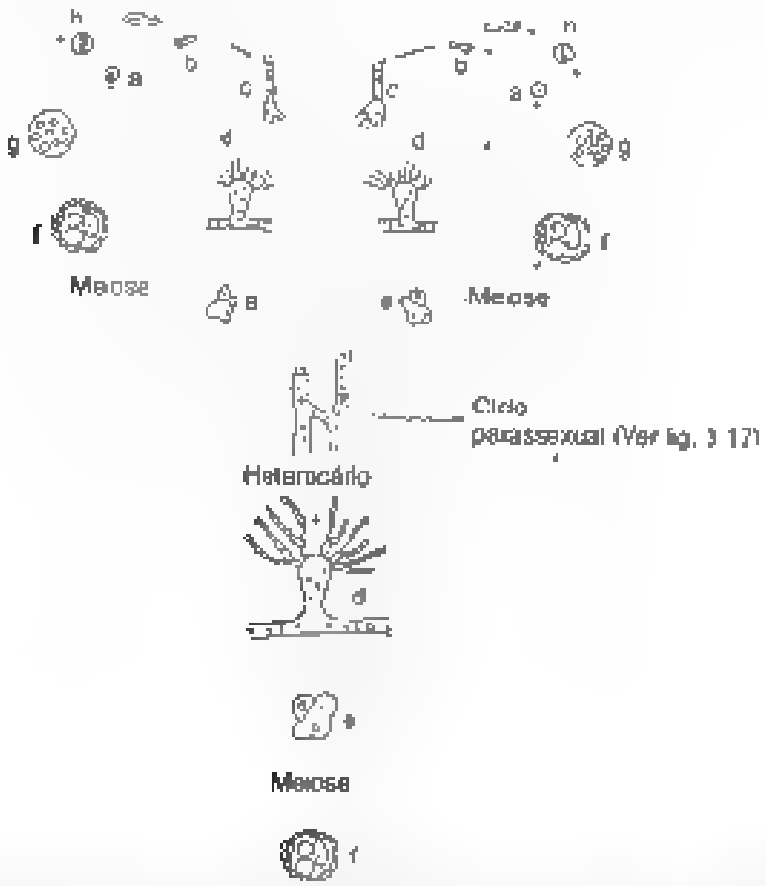


Figura 3.13 – Ciclo sexual de *Aspergillus nidulans* (modificado de Azevedo e Costa, 9: a) Conídio; b) Conídio germinando; c) Hifa; d) Conidióforo; e) Célula-mãe de ascos (ascos); f) Cleistotécio com ascos; g) Asco com 8 ascósporos; h) Ascósporo; i) Ascósporo germinando.

Todas as três espécies têm sido amplamente usadas em Genética. Nesses fungos e em outros que possuem ciclo sexual fica fácil estabelecer cruzamentos para estudos genéticos e para programas de melhoramento genético. Existindo mutantes, a análise genética pode ser realizada com facilidade e, dependendo do fungo, as análises podem ser feitas a partir de esporos sexuais ordenados em compartimento do corpo de frutificação, como ocorre em *Neurospora crassa*. Pode ser feita também por análise de esporos sexuais não ordenados como em *Saccharomyces cerevisiae* ou ainda, por esporos sexuais coletados ao acaso como em *Aspergillus nidulans*. A Fig. 3.16 mostra alguns exemplos dessas análises genéticas.

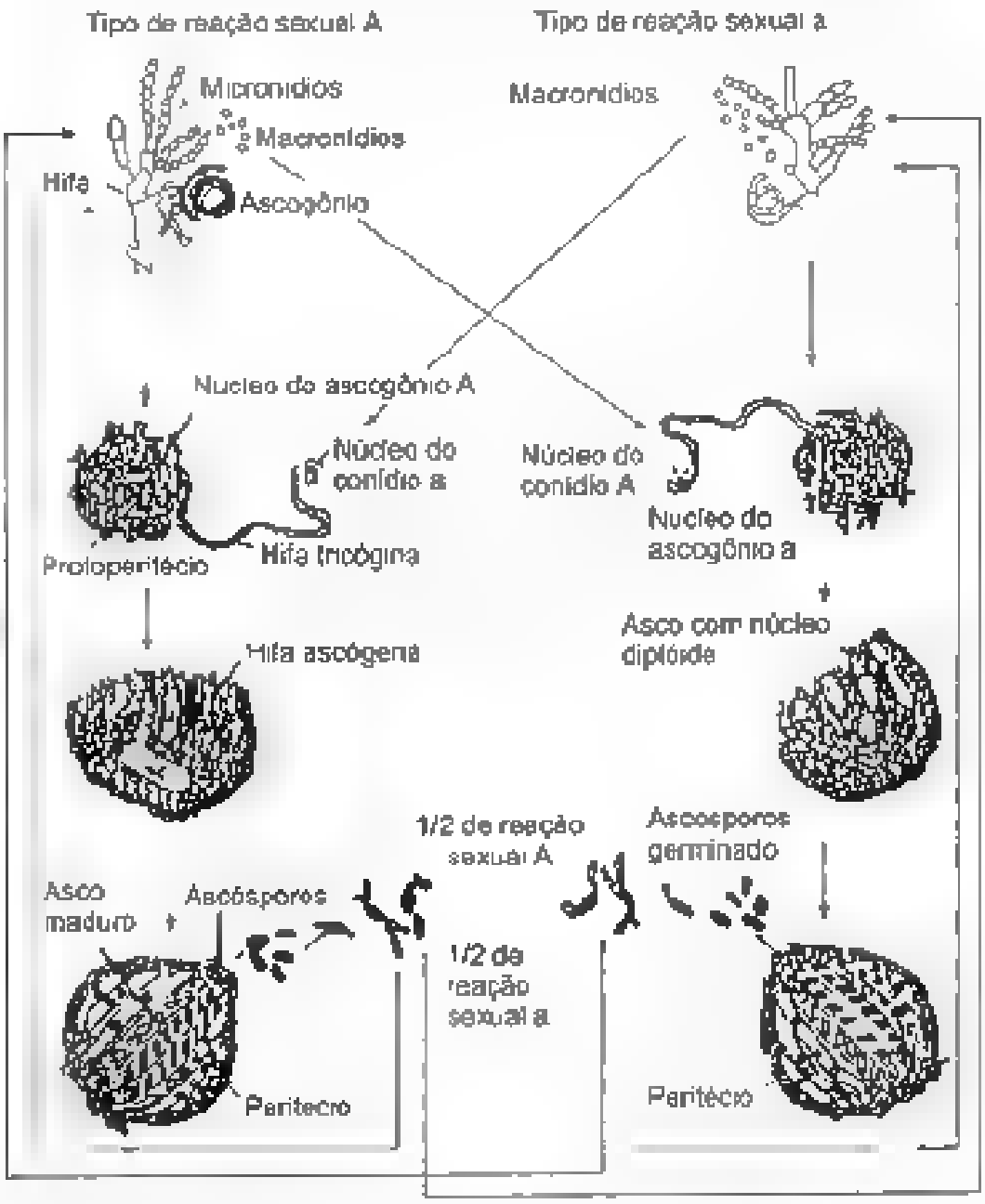


Figura 3.14 – O ciclo sexual no fungo *Neurospora crassa* (Stickberger, 3)

Figura 3.15 Ciclo sexual heterotálico [illegible] após fecundação sexual [illegible]

3.3.2.2 O ciclo parassexual em fungos

O ciclo parassexual foi descrito pela primeira vez no fungo *A. nidulans*. Graças à existência de mutantes para coloração de conídeos e mutantes auxotróficos, foi possível colocar duas linhagens de cores de conídeos distintas e auxotróficas também distintas em um meio líquido mínimo, com uma pequena quantidade de meio completo para permitir apenas o início da germinação dos conídeos. Nesse caso, ocorreram anastomoses de hifas com a formação de heterocários (dois núcleos geneticamente distintos em um citoplasma comum). Esses heterocários podiam crescer em meio mínimo, pois um núcleo fornecia o que faltava para o outro. Entretanto, como o fungo tem conídios uninucleados, os conídeos dos heterocários eram iguais aos das linhagens que o formaram e não podiam crescer no meio mínimo. A semeadura de milhões de conídeos provenientes de um heterocário em meio mínimo produziu, entretanto, algumas colônias prototróficas. Essas, com surpresa, eram diplóides, o que foi constatado pelo volume de seus conídeos, que era o dobro do das linhagens originais que formaram o heterocário, pela quantidade de DNA em seus núcleos que era também o dobro da encontrada em conídeos haplóides e pela possibilidade que essas colônias tinham de formar setores, principalmente se transferidos para meio completo. A análise genética desses setores revelou serem alguns recombinantes haplóides originando-se por um processo de não disjunção com perda de cromossomos até o estado original haplóide ser atingido. Outros eram diplóides originando-se por permutação ou "crossing over" mitótico (Fig. 3.17).

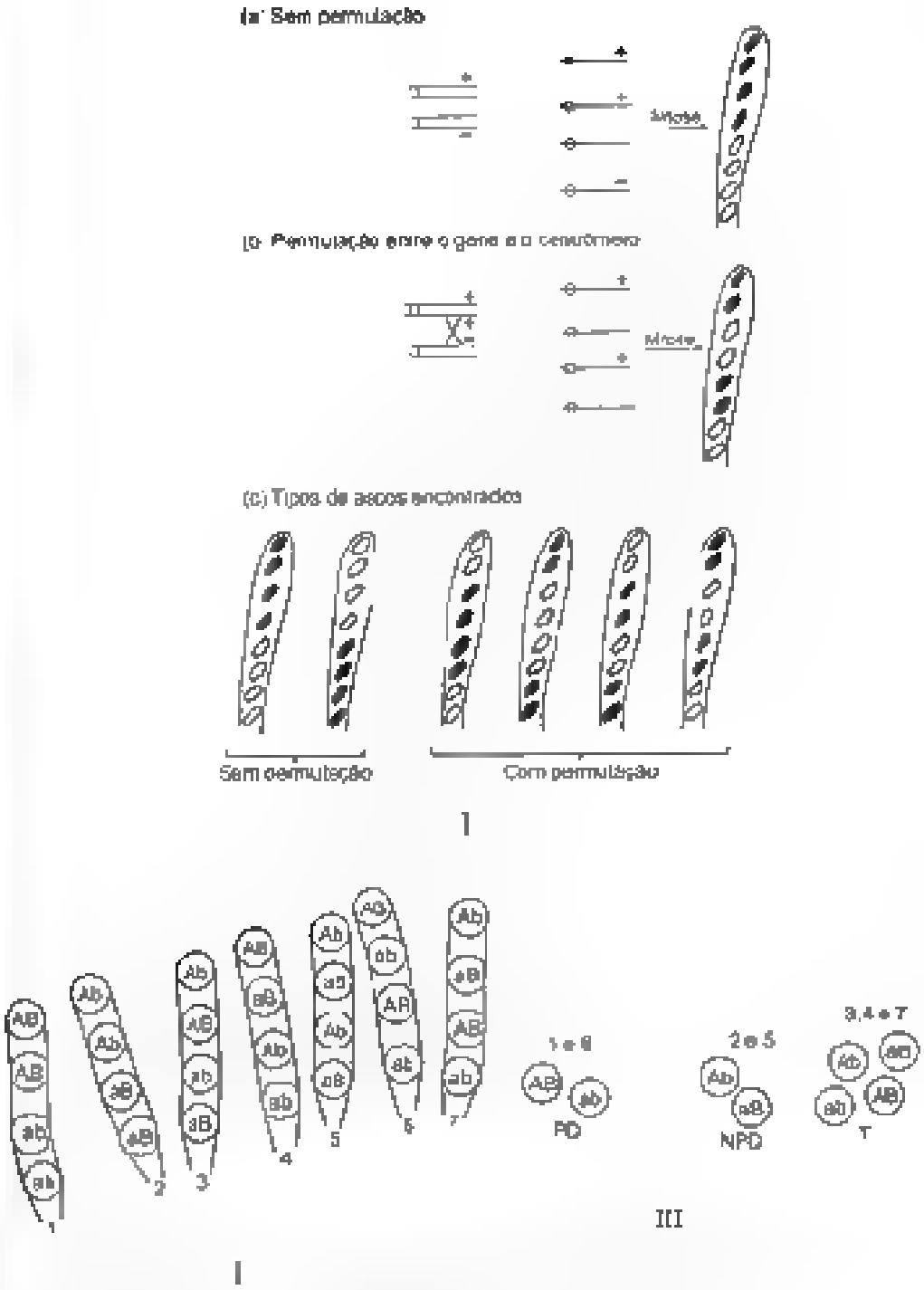


Figura 3.16 Exemplos de análise genética em fungos. Análise genética em fungos: (a) mostra ascos com esporos arranjados em ordem linear. (b) esporos parentais e esporos de ascos (c) ascos longos e possível construção de mapas genéticos para determinação da distância entre um gene e o centrômero. Tipos de ascos encontrados quando dois genes são analisados com relação ao gene A e B. Se esses genes são analisados de forma independente, tipos encontrados em a e b resultam em tétrades parentais ditipicas (PD), não parentais ditipicas (NPD) e tetratipicas (T), o que ainda permite que várias relações entre os genes analisados possam ser obtidas.

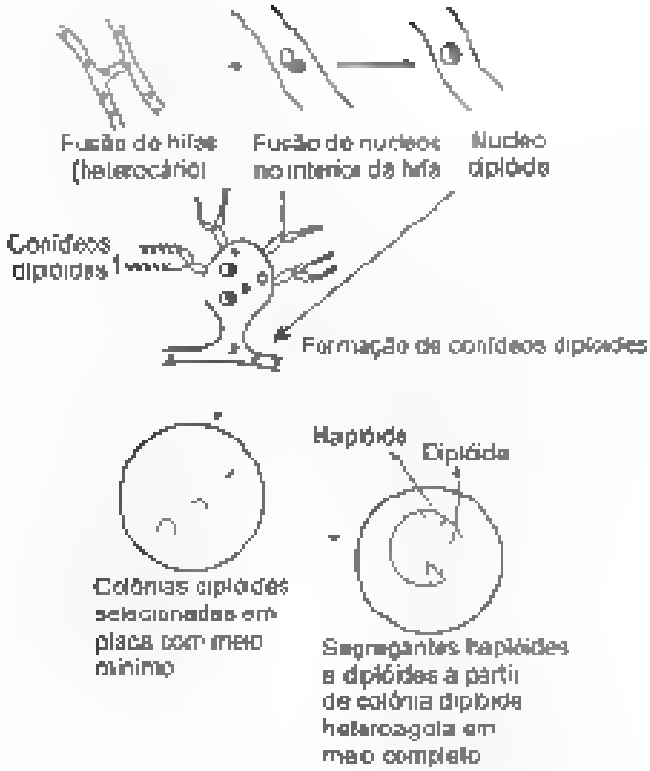


Figura 3.17 O ciclo parassexual em fungos

Em ambos os casos apareceram recombinantes, o que permitiu um novo processo de análise genética, propiciando um tipo de mapeamento de genes em seus respectivos cromossomos. Após ser descrito em *A. nidulans*, ele foi constatado em *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e muitos outros fungos imperfeitos que não possuem ciclo sexual e que, portanto, não eram facilmente estudados do ponto de vista genético. Dentre os deuteromicetos estão importantes fungos de interesse biotecnológico utilizados na produção de antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas, no controle biológico de insetos, etc. O ciclo parassexual, ao invés da terminologia sexo, permitiu que o genético e o melhoramento genético fosse feito com grande sucesso como em *A. niger*, *Trichoderma* e *Penicillium*. Em *A. nidulans* que possui ambos os ciclos sexual e parassexual, uma comparação entre os mesmos pode ser feita (Tab. 3.2).

Hoje o ciclo é conhecido em dezenas de fungos (Tab. 3.3), variações nesse ciclo podem ocorrer. Uma delas, descoberta em *A. niger* é a paramixose (30) onde recombinantes podem ser obtidos sem isso aumento de um diplóide estável (Fig. 3.18). A paramixose foi descrita em *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, ambos de valor no controle biológico de insetos (3, 32) e pode ser explicada como sendo causada por diplóides transitórios, transposons ou mesmo por transformação dentro das hifas.

Tabela 3.1 Correlação entre os principais eventos que ocorrem nos ciclos sexuado e parassexual

Ciclo sexuado	Ciclo parassexual
1. Fusão nuclear em estruturas especializadas, não lítica, resultando zigotos diplóides.	1. Fusão nuclear rara em qualquer ponto do micélio diplóide.
2. O zigoto formado é efêmero, persistindo por apenas uma geração nuclear.	2. O diplóide não é efêmero e sofre mitoses, dando mais núcleos diplóides.
3. Meiose com recombinação meiótica no estágio de quatro núcleos e volta ao estágio haplóide.	3. Recombinação, ora por permutação em vários níveis. Ocorre haploidização para não disjunção.
4. Os produtos meióticos, ascósporos são facilmente reconhecidos e isolados.	4. Os recombinantes mitóticos, se utilizados marcadores apropriados, emergem como setores, crescimentos ou colônias isoladas.

3.2.3 Fusão de protoplastos em fungos

Embora seja um mecanismo parassexual de obtenção de recombinantes facilitando heterocariose, que é o primeiro passo da parassexualidade, a fusão de protoplastos, pela sua importância, vai ser descrita separadamente do ciclo parassexual. Mesmo em fungos que possuem ciclo sexual ou parassexual, a heterocariose nem sempre é possível, devido à incompatibilidade de anastomoses ocasionada pela parede celular. A possibilidade de se produzir células inteiramente desprovidas ou apenas com resquícios de parede celular, os protoplastos (com total ausência de parede) ou esferoplastos (devido ao seu formato esférico em meio com estabilizadores osmóticos, podendo conter ou não restos de parede) abre a possibilidade de se fundir células as mais diversas, não só de fungos mas de praticamente quaisquer células, bem independentemente quanto mais distantes são as células de espécies envolvidas, mais dificulta sua viabilidade e multiplicação. Protoplastos podem ser obtidos de diferentes maneiras, mas, de modo geral, o tratamento de um fungo com enzimas que destroem a parede celular é o preferido. Isso é feito em meio com alta concentração de sais ou açúcares (estabilizadores osmóticos), para evitar o rompimento das células. Os detalhes de obtenção de protoplastos podem ser encontrados em várias publicações (1, 2, 27, 33, 34, 35, 36). Obtidos os protoplastos, a fusão pode ser feita por adição de agentes fusogênicos ao meio, como o polietileno glicol ou abreviadamente PEG, ou por correntes elétricas, por um processo conhecido como eletrofusão (Fig. 3.19).

Tabela 3.3 [illegible] de espécies de fungos [illegible]

Ascochyta imperfecta
Aspergillus amstelodami
Aspergillus flavus
Aspergillus fumigatus
Aspergillus nidulans
Aspergillus niger
Aspergillus oryzae
Aspergillus ruguloses
Aspergillus sojae
Beauveria bassiana
Cephalosporium acremonium
Cephalosporium mycophyrum
Cochliobolus sativus
Coprinus funelarius
Coprinus lagopus
Dycyostelium discoideum Oniaconiectio.
Fusarium oxysporum f. sp. caulstephi
Fusarium oxysporum f. sp. cullense
Fusarium oxysporum f. sp. pisi
Fusarium solani
Metarhizium anisopliae
Microsporum gypseum
Penicillium chrysogenum
Penicillium digitatum
Penicillium expansum
Penicillium italicum
Phycomyces blakesleanus
Phymatotrichum omnivorum
Phytophthora infestans
Pyricularia oryzae
Puccinia graminis tritici
Saccharomyces cerevisiae
Schizophyllum commune
Ustilago hordei
Ustilago maydis
Ustilago violacea
Verticillium albo-atrum
Verticillium dahliae var. longisporum

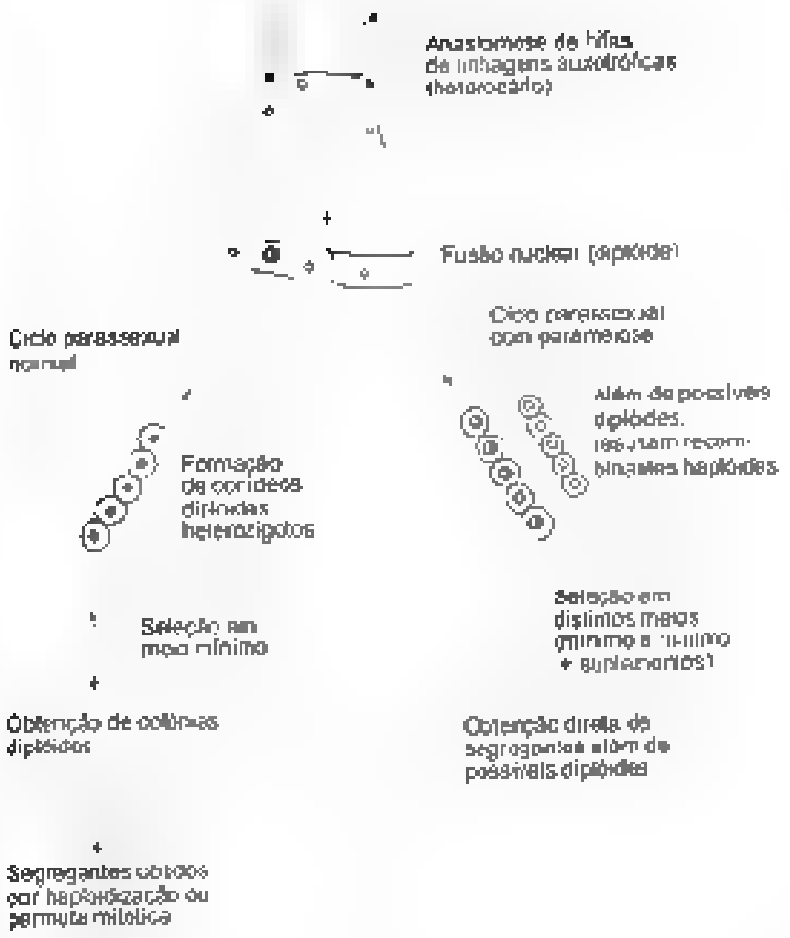


Figura 3.18 Comparação entre o ciclo parassexual típico e a paramerose em fungos.

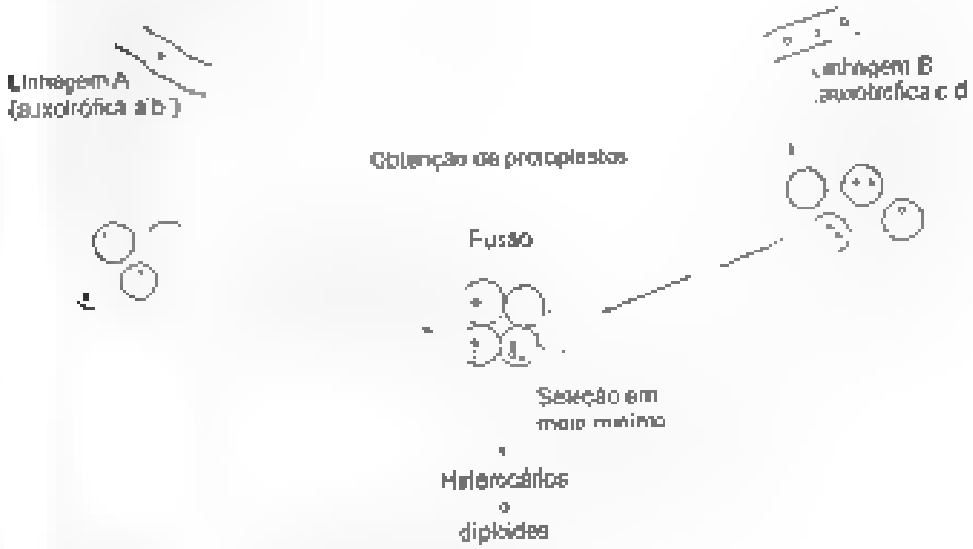


Figura 3.19 Fusão de protoplastos em fungos: a, b e c, d representam mutantes auxotróficos.

[illegible] protoplastos isolados apenas algumas vezem fusão. [illegible] [illegible] [illegible]

Há três destinos desse DNA que penetra nas células. Ele pode ser integrado ao cromossomo do fungo em local de homologia com o genoma carregado e pode substituir o gene homólogo no fungo [illegible] ou ele pode ser inserido em outro local do genoma do fungo que não a região homóloga a ele. Em qualquer dos casos está ocorrendo recombinação. Dessa maneira o processo de transformação em fungos é de grande importância para a realização de pesquisas básicas e aplicadas nesse Reino.

[illegible]

A transformação genética [illegible] em fungos, aliada à facilidade de produção de protoplastos, tornou possível a aplicação da tecnologia do DNA recombinante nos mesmos. Atualmente a clonagem de genes em fungos e sua expressão é comumente realizada, ampliando sobremaneira as possibilidades de obtenção de produtos importantes do ponto de vista biotecnológico, tendo esses microrganismos, em especial os fungos, [illegible] além de [illegible] usados [illegible] na produção de bebidas, alimentos e fármacos. [illegible] Detalhes [illegible] dessa tecnologia podem ser encontrados em Azevedo [illegible] [illegible] Biologia Molecular surgiram também [illegible] técnicas para a separação de cromossomos, para estudar variabilidade genética e para mapeamento cromossômico, entre outras. Essas técnicas são conhecidas por siglas como CHEF e OFAGE para separação de cromossomos em campo pulsado [illegible] PCR e RAPD para mapeamento genético e para amplificação de segmentos de DNA e estudos de variabilidade. Elas têm permitido um maior conhecimento dos fungos e de outros microrganismos do ponto de vista da sua genética [illegible] facilitando os processos de melhoramento genético.

3.3.3 – Recombinação em outros microrganismos

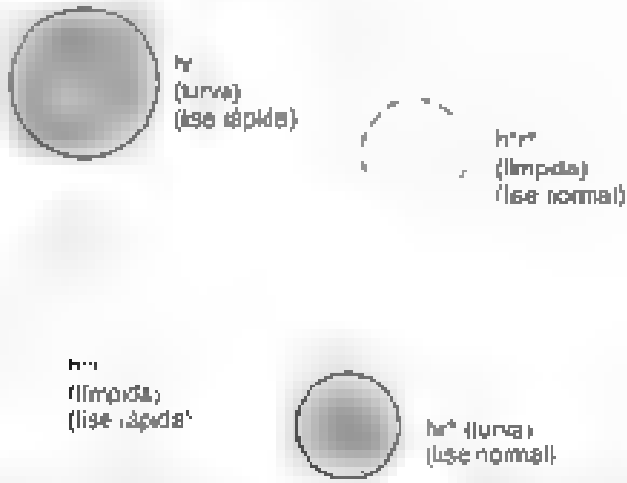
[illegible] estudo genético ou biotecnológico, a recombinação também se verifica em vírus, algas [illegible]. Resumidamente serão apresentados os principais sistemas de recombinação nos mesmos.

3.3.3.1 – Recombinação nos vírus

Os vírus permitiram em vários casos a elucidação de importantes aspectos genéticos [illegible] estimativas das dimensões dos genes. Os vírus mais empregados são os bacteriófagos. Como já [illegible] em um dos processos de recombinação bacteriana, a transdução. Entre eles os bacteriófagos [illegible] apresentam um

sistema de recombinação. O processo é simples. Infectando-se uma célula bacteriana com duas ou mais linhagens mutantes de fagos, ocorre síntese de DNA no interior das bactérias que depois de algum tempo sofrem lise e liberam partículas de fagos. Dentre essas partículas, além dos tipos parentais, aparecem recombinantes. Um dos primeiros exemplos de recombinação em fagos foi descoberto por Hershey e Rotman em 1949 (41). Eles infectaram duas linhagens B e B/2 de E. coli com dois tipos de bacteriófagos, o primeiro com genótipo h+r+ (h+ tem afinidade e ataca as duas linhagens de E. coli e r+ da lise normal) e o segundo com genótipo h-r- (ataca só uma das linhagens e tem placa de lise rápida e portanto maior que a selvagem r+). Apareceram entre as partículas virais que resultaram das células usadas os dois tipos parentais, além de dois outros tipos, os recombinantes h+r- e h-r+ (Fig. 3.20). Experimentos infectando-se bacterias com três tipos de fagos mostraram que recombinantes entre os três tipos podem ser recuperados. Suas frequências são compatíveis com permuta ou "crossing over" entre eles, sempre dois a dois em vários ciclos ou turnos de recombinação.

Figura 3.20 [illegible]



[illegible]

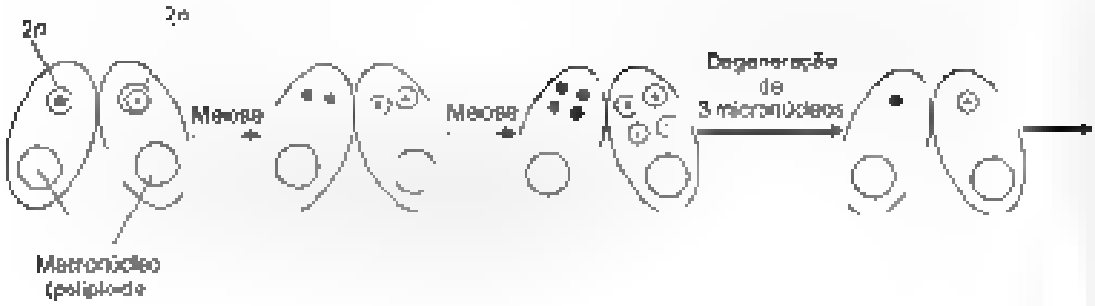
Os bacteriófagos e outros vírus são também de valor na tecnologia do DNA recombinante, como vetores de genes e como modelos para diferentes experimentos genéticos. Também sua importância aplicada vem sendo cada vez mais acentuada nas áreas do saúde e controle biológico de insetos pragas da agricultura como é o caso dos baculovírus que são patogenos de importância para pragas como a Lagarta da soja (2, 34, 42).

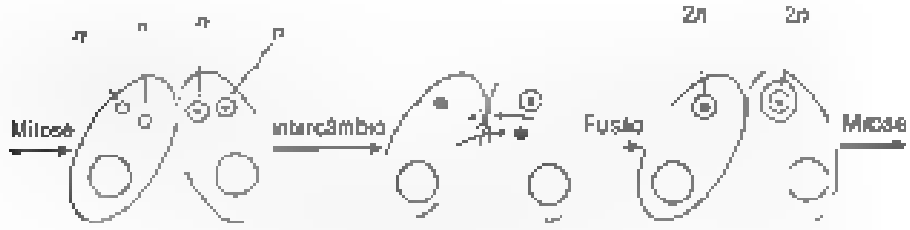
3.3.3.2 – Recombinação em protozoários

[illegible]

[illegible]

[illegible]


2n
2n
Meiose
Meiose
Degeneração
de
3 micronúcleos
Micronúcleo
(poliploide)


n
n
n
n
Mitose
intercâmbio
2n
2n
Fusão
Mitose


Futuros micronúcleos
Mitose
Desintegração
do macronúcleo
e diferenciação
dos micronúcleos
Término da
conjugação e
desintegração
do micronúcleo
desintegram

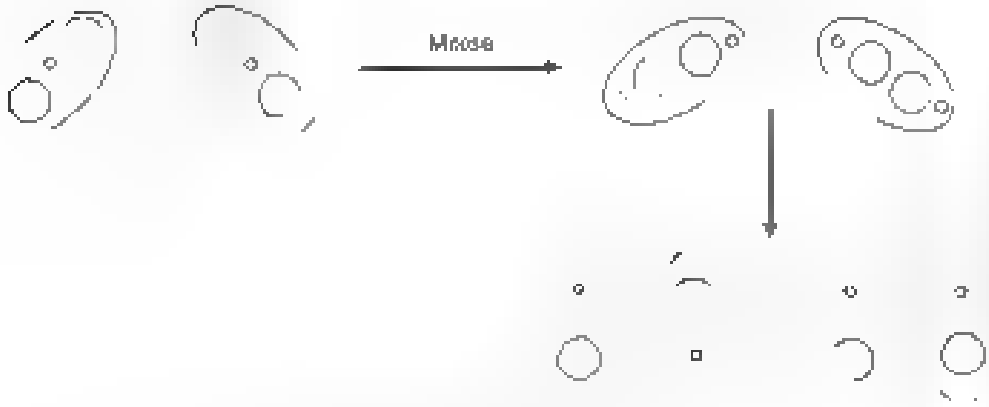

Mitose

Figura 3.21 [illegible]

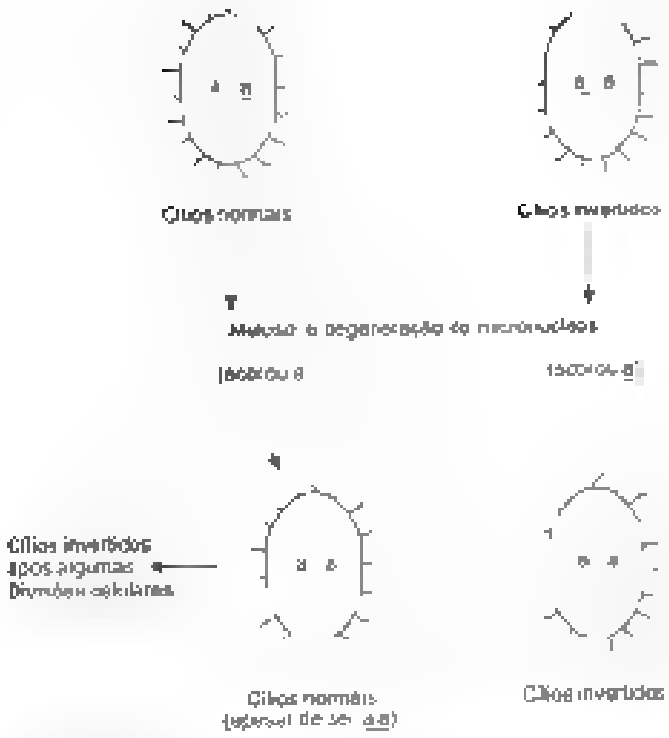


Figura 3.22 Herança [illegible] Ciliados [illegible] apresentam [illegible] o mesmo genótipo [illegible] sofrem [illegible] produto do gene [illegible] o que [illegible] cílios normais [illegible] apresentam cílios invertidos.

3.3.3.3 Recombinação em algas

A exemplo dos protozoários, pesquisas genéticas em algas são também muito menos numerosas que em bactérias e fungos. Os principais exemplos de estudos genéticos estão dentro do grupo das algas verdes ou clorofíceas, sendo a espécie *Chlamydomonas reinhardtii* a mais utilizada. Ela apresenta um sistema de recombinação, a conjugação, onde dois tipos de reação sexual designados de mt+ e mt- são conhecidos. Quando duas células de tipos sexuais opostos se encontram, pode resultar fusão celular ou conjugação, produzindo-se um zigoto diplóide. O núcleo diplóide do mesmo sofre meiose, dando quatro células haplóides, duas com um tipo de reação sexual e duas com o tipo oposto. A Fig. 3.23 apresenta os passos da conjugação nessa alga. Assim como há segregação de 1:1 para o gene do tipo de reação sexual, outros genes cromossômicos de algas também apresentam o mesmo tipo de segregação. Em *Chlamydomonas* podem ser usados meios definidos, ou seja, de composição simples. Mutantes auxotróficos, morfológicos e para resistência a drogas são empregados, o que facilita a análise genética.

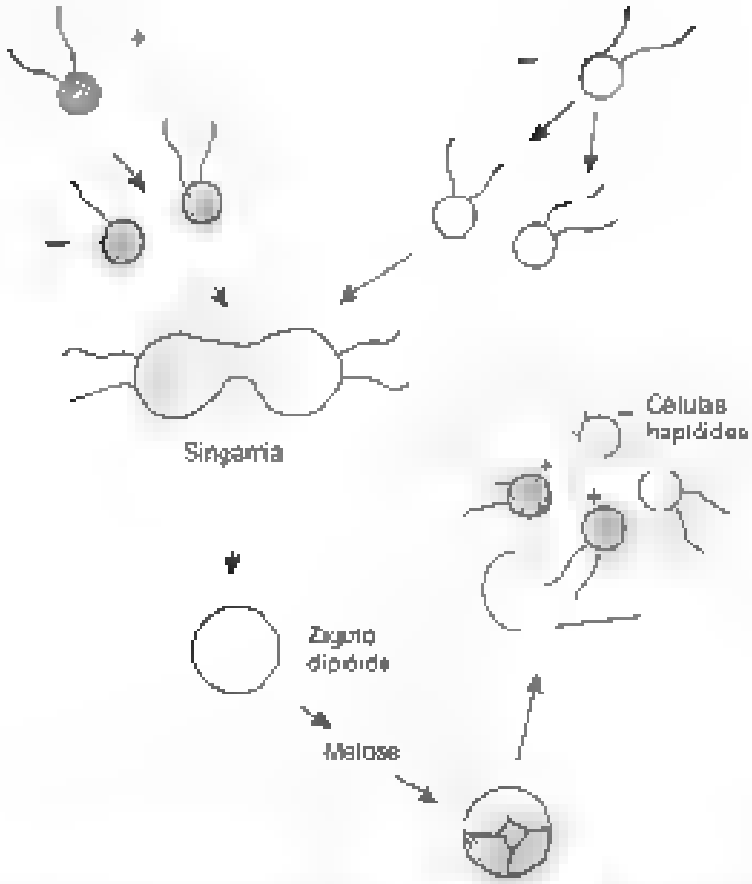


Figura 3.21 A conjugação na alga [illegible] Celulas [illegible] de reação sexual [illegible] formam singamia [illegible] um zigoto diplóide. Por meiose, quatro células haplóides são formadas [illegible] e dividem.

A genética de algas verdes é rica em exemplos de herança citoplasmática. Algumas dessas algas têm apenas um cloroplasto que contém DNA. Assim, existem genes nucleares e extranucleares ou extracromossômicos que podem ser estudados separadamente. Genes para resistência a antibióticos e para fotossíntese estão localizados, em algas verdes, no DNA dos cloroplastos. Isso torna as algas um atrativo material de estudo de genes localizados em DNA do cloroplasto.

3.4 – Herança extracromossômica em microrganismos

Já foram citados várias vezes neste capítulo que elementos extracromossômicos e portanto casos de herança extracromossômica, são detectados em microrganismos. Em algas e protozoários os casos são muito freqüentes, tornando-os um material apropriado para esse tipo de estudo. Mas é novamente em bactérias e fungos que casos de herança extracromossômica adquirem uma importância toda especial. Alguns deles vão ser citados a seguir.

3.4.1 Plasmídeos bacterianos

Bactérias podem conter elementos extracromossômicos, dos grandes de plasmídeos. Estes possuem cada dupla hélice relativamente curta do cromossomo bacteriano, são constituídos por DNA. Embora bem menores que os cromossomos e não sejam essenciais para a sobrevivência das bactérias que os albergam, permanecem em quantidades de cópias. Os plasmídeos carregam genes que conferem características gerais aos seus hospedeiros, essas características não essenciais graças ao cromossomo bacteriano, a maneira quando o plasmídeo se incorpora a mesma e que pode conter em alguns deles. Esse é o caso do plasmídeo F, o mais conhecido e tem sobre conjugação bacteriana e mesmo o bacteriófago envolvido na transdução especializada que também pode ser considerado um plasmídeo. Plasmídeos que podem existir no estado extracromossômico ou integrado ao cromossomo são chamados de episomos e esses estados são reversíveis, como ocorre com o plasmídeo F e o bacteriófago λ. Alguns dos principais plasmídeos bacterianos, tais como F, R e Col serão descritos a seguir.

3.4.2 Plasmídeos R

Plasmídeos R carregam genes que conferem resistência a diversos tipos de inibidores como antibióticos, quimioterápicos e sais de metais pesados. Eles foram pela primeira vez estudados no Japão quando surgiu a preocupação de resistência múltipla a drogas em bactérias encontradas em pacientes com disenteria bacteriana. Depois disso, muitos outros casos foram descritos em todas as partes do mundo, conferindo a esses plasmídeos grande importância do ponto de vista médico. [14]

Os plasmídeos R e seus homólogos F e Col podem em sua grande maioria ser transferidos de uma célula para outra, pois têm genes que carregam informações para essa transferência. Devem, além disso, carregar genes que os tornam resistentes a vários antibióticos, como penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e outros, para citar apenas três classes de antibióticos, e para sais de metais pesados, como o mercúrio, por exemplo. O mecanismo de resistência conferido por esses genes é diferente, sendo a resistência a antibióticos devida a genes que codificam enzimas capazes de inativar os antibióticos, impedindo a ação deles, mas também há outras formas de resistência, como a alteração do alvo do antibiótico, a redução da permeabilidade da parede celular e a ativação de bombas de efluxo que expulsam os antibióticos para fora da célula. Essas características se tornam cada vez mais frequentes e preocupantes, pois a indústria farmacêutica tem dificuldade em acompanhar o ritmo de produção de novos antibióticos, devido ao custo elevado e à baixa lucratividade. Também plasmídeos que conferem resistência a metais pesados, como o mercúrio, são muito importantes para a sobrevivência das bactérias que os albergam, pois permitem que elas sobrevivam em ambientes contaminados por esses metais. Os plasmídeos carregam genes que conferem características gerais aos seus hospedeiros, essas características não essenciais graças ao cromossomo bacteriano, a maneira quando o plasmídeo se incorpora a mesma e que pode conter em alguns deles. Esse é o caso do plasmídeo F, o mais conhecido e tem sobre conjugação bacteriana e mesmo o bacteriófago envolvido na transdução especializada que também pode ser considerado um plasmídeo. Plasmídeos que podem existir no estado extracromossômico ou integrado ao cromossomo são chamados de episomos e esses estados são reversíveis, como ocorre com o plasmídeo F e o bacteriófago λ. Alguns dos principais plasmídeos bacterianos, tais como F, R e Col serão descritos a seguir.

3.4.1.2 - Plasmídeos colicinogênicos

Descritos pela primeira vez em *E. coli*, de onde provem seu nome, esses plasmídeos carregam genes para produção de colicinas. Estas são substâncias antimicrobianas de curto espectro que conseguem matar linhagens de bactérias da mesma espécie ou de espécies muito relacionadas. Após sua descoberta em *E. coli*, elas foram também constatadas em muitas outras bactérias, donde esses plasmídeos receberam uma designação mais geral, de bactericinogênicos e os agentes antibacterianos, de bactericinas. Como no caso dos plasmídeos R, os plasmídeos produtores de bactericinas são usados como vetores em Engenharia Genética.

3.4.1.3 - Plasmídeos de *Staphylococcus*

Esse gênero bacteriano é rico em plasmídeos, alguns de grande importância médica, como os plasmídeos produtores de penicilinase, enzima que inativa a penicilina, tornando a bactéria que a possui resistente a esse antibiótico. Sabe-se que esses plasmídeos podem carregar também outros genes que conferem resistência a arsenato, arsenito, mercúrio, cobre, cádmio, neomicina, eritromicina, etc. Várias cópias desses plasmídeos podem existir em uma mesma célula. Como os plasmídeos R, eles também podem causar problemas pois as bactérias resistentes são frequentemente encontradas sobrevivendo ao tratamento com os mais diversos antimicrobianos.

3.4.1.4 - Outros tipos de plasmídeos

Muitos outros tipos de plasmídeos já foram descritos, como os que conferem competência a transformação em algumas bactérias, os que dão características de produção de ácido sulfídrico e os relacionados à patogenicidade. Podem ser encontradas revisões sobre outros tipos de plasmídeos, além dos plasmídeos já mencionados. Há, ainda, são descritos inclusive plasmídeos crípticos, detectados por exemplo por processos eletroforéticos, mas que não produzem aparentemente qualquer diferença fenotípica nas células que os contêm. Não se sabe em bactérias mas em outros seres vivos eles foram detectados. O plasmídeo 2μ de leveduras é um exemplo. Também o DNA mitocondrial dos vírus e cloroplastídico podem ser considerados plasmídeos.

A importância dos plasmídeos é enorme, tanto para a sobrevivência e evolução de uma espécie, principalmente aquelas que se acham em um grande número de indivíduos para resistir a modificações do meio ambiente. É o caso, por exemplo, das bactérias onde a alta variabilidade existente permite que as sobrevivam aos mais diversos agentes nocivos. Sendo extracromossômicos, essa variabilidade não substitui apenas adiciona novas propriedades às células, permitindo sua adaptação a ambientes adversos. Melhor ainda, podem ser perdidos facilmente e também recuperados por recombinação, esses elementos extracromossômicos fornecem uma capacidade de rápidas modificações nas propriedades das espécies que os possuem.

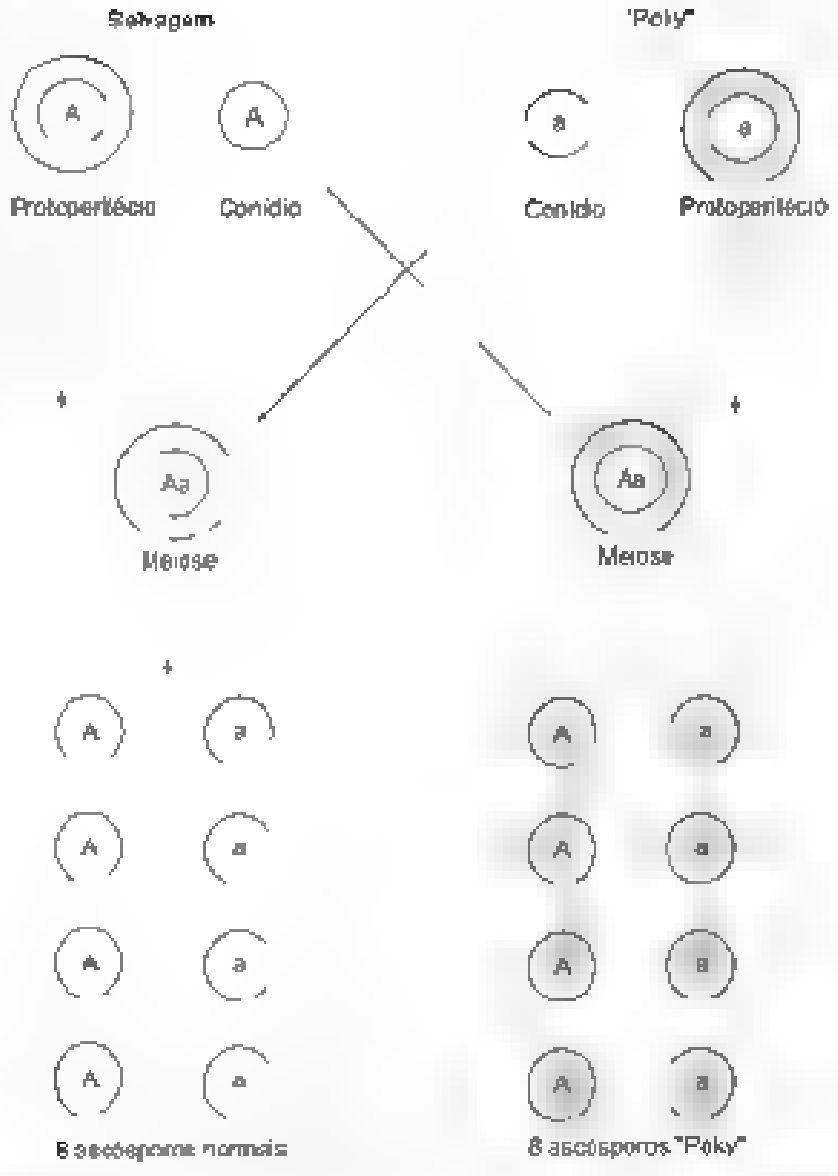


Figura 3.24 Herança extracromossômica. Neurospora "poky". As Neurospora [illegible] Os descendentes são sempre iguais à mãe, que fornece o citoplasma (protoperitécio), independentemente do sexo da reação sexual ou de genes nucleares.

3.4.2 Herança extracromossômica em fungos

O reino dos fungos também é rico em exemplos de herança extracromossômica ou extranuclear, no caso, pois esses são microrganismos eucarióticos, dotados de núcleo típico. Um exemplo em fungos filamentosos e outro em leveduras vão ser descritos a seguir. Mais exemplos podem ser encontrados em várias revisões, livros e trabalhos a respeito da herança extranuclear em fungos (1, 10, 45, 46, 47).

3.4.2 – Colônias 'poky' em *Neurospora crassa*

Mutantes 'poky' possuem a [illegible] velocidade quando comparado com linhagens selvagens [illegible]. Esse tipo de mutante é herdado sempre que a linhagem mutante é usada como "mãe" [illegible] e núcleos [illegible] da linhagem pai, que será nesse caso, para os descendentes, uma linhagem selvagem. [illegible] uma linhagem que tem [illegible] que [illegible] para a produção dos descendentes [illegible]. A Fig. 3.24 apresenta [illegible] Nesse caso a organela [illegible] que entra com o material genético para dar [illegible] mutante [illegible] A linhagem usada como mãe é a que fornece a grande quantidade de citoplasma, incluindo os mitocondrios que vão ser incorporados aos descendentes. Fica portanto que direção na cara tem [illegible] em um caso de herança extracromossômica mitocondrial.

3.4.2.2 – Colônias "Petite" de leveduras

Em [illegible] leveduras [illegible] em menos [illegible] produzir [illegible] de tamanho pequeno [illegible] pelas. As [illegible] de [illegible] apresentam [illegible] por falta [illegible] de enzimas respiratórias possuem [illegible] herdado [illegible]. Algumas [illegible] petite [illegible] segregação mendeliana normal [illegible] petite [illegible] produzem por meiose [illegible] petites [illegible] normais e petites [illegible] segregação [illegible]. Entretanto, na maioria dos casos a segregação de um cruzamento normal petite produz os quatro descendentes normais e petites [illegible] quantidades variáveis não mendelianas chegando a quatro petites e nenhum normal petites supressivas. Os petites segregacionais [illegible] localizada no cromossomo e portanto não [illegible] casos de herança extracromossômica. Os mutantes tem falta total de DNA mitocondrial e associam-se com [illegible] normais tem suas mitocondrias [illegible]. Os supressivos perderam em diferentes graus parte de seu DNA mitocondrial.

3.4.3 Critérios para se estabelecer casos de herança extracromossômica

O geneticista mais otimista e todos os que trabalham com microorganismos devem estar sempre alertas para [illegible] entre características genéticas e aquelas que são [illegible] apenas por alterações de ambiente. Também devem estar alertas para [illegible] características genéticas são regidas por genes extracromossômicos [illegible] mais [illegible] que as extracromossômicas. Tribo [illegible] Lucade [illegible]

3.5 – Considerações finais

grande parte utilizam microrganismos como hospedeiros de genes ou DNAs de microrganismos como vetores para transferência de genes de uma espécie para outra. Finalmente, a introdução cada vez mais frequente de espécies microbianas em processos biotecnológicos tornam o estudo da Genética de Microrganismos fundamental para que possam ser realizados programas de melhoramento genético cada vez mais eficazes nessas espécies.

Referências bibliográficas

(1) AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia. Ed. Universidade Federal de Goiás, 1998.

(2) AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba. Ed. FEALQ, 1985.

(3) COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo. Manole, 1987.

(4) HENRIQUES, J.A.P.; QUEROL, C.B. Bases moleculares da mutação. In: COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo, Manole, 1987. p. 17-34.

(5) DEMEREC, M.; ADELBERG, E.A.; HARTMAN, P.H. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. **Genetics**, v. 54, p.61-76, 1966.

(6) LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E.M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 63, p.399-406, 1952.

(7) SILVEIRA, W.D.; AZEVEDO, J.L. Derivation of auxotrophic mutants from Metarhizium anisopliae by the filtration technique. **Revista Brasileira de Genética**, v. 7, p.1-8, 1984.

(8) AZEVEDO, J.L. **Tópicos de genética microbiana e molecular. Genéticas de Procariotos**. Piracicaba. Publ. Instituto de Genética, 1977. v.II.

(9) AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo. Casa Ed. Nacional, 1973.

(10) BAINBRIDGE, B.W. **Genetics of microbes**. Glasgow. Blackie, 1980.

(11) BURNETT, H. **Mycogenetics**. Londres. John Wiley & Sons, 1975.

(12) FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. Oxford. Blackwell, 1979.

(13) STRICKBERGER, W.W. **Genetics**. Nova York. MacMillan, 1985.

(14) AZEVEDO, J.L. Genética de microrganismos. In: BERGAK, W.; FROTA PESSOA, O. (Coords.). **Genética médica**. São Paulo. Sarvier, 1973. p.4-65.

(15) LURIA, S.E.; DELBRUCK, E. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. **Genetics**, v.28, p.491-511, 1943.

(16) NEWCOMBE, H.B. Origin of bacterial variants. **Nature**, Londres, v.164, p.150-151, 1949.

(17) AVERY, O.T.; MACLEOD, C.M.; McCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. **Journal Experimental Medicine**, v.79, p.137-158, 1944.

(18) LEDERBERG, J.; TATUM, E.L. Gene recombination in Escherichia coli. **Nature**, Londres, v.158, p.558, 1946.

(19) ZINDER, N.D.; LEDERBERG, J. Genetic exchange in Salmonella. **Journal of Bacteriology**, v.64, p.679-699, 1952.

(20) HAYES, W. The mechanism of gene [illegible] in Escherichia coli. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, v. 18, p. 543, 1953.

21. SOLZA, F. C. Plasmídios bacterianos. In: COSTA, S. O. P. (Coord.). **Genética molecular de microrganismos**. São Paulo: Manole, 1987. p. 273-299.

(22) JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. [illegible], p. 318-356, 1961.

23. GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. **Journal of Hygiene**, v. 27, p.113-159, 1928.

24. MORSE, M.L.; LEDERBERG, E.M.; LEDERBERG, J. Transduction in Escherichia coli K12. **Genetics**, v.41, p.142-144, 1956.

25. McCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v. 36, p. 344-355, 1950.

(26) AZEVEDO, J.L.; ROPER, A. Mutant non-conjugative or Agrobacter tumefaciens. Successive and transposable genetic changes. **Genetical Research**, Cambridge, v. [illegible], p. 189-197.

27. AZEVEDO, J.L. Novos sistemas de recombinação em microrganismos. **O Biológico**, v. 50, p. 5-25, 1984.

28. NEWCOMBE, W.M.C. Elementos genéticos móveis em [illegible]. In: COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética Molecular de Microrganismos**. São Paulo: Manole, 1987. v. 29, p. 405.

29. PONTE, C.; CORVO, C.; ROPER, A. Conjugation without sexual reproduction by means of plasmid in Aspergillus nidulans. **Journal of General Microbiology**, v. [illegible], p. [illegible]-952.

30. MONATEL, L.; AZEVEDO, J.L.; VAL, N.; C.L. Parasexuality in a citric acid producing strain of Aspergillus niger. **Revista Brasileira de Genética**, v. [illegible], p. 399-409, 1986.

(31) BALA, H.P.; VALADARES, M.C.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 261-271, 1991.

32. PACCOLA-MEIRELLES, L.S.; D'ALESSIO, P.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in Beauveria bassiana. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 57, p. [illegible]-[illegible], 1991.

33. AZEVEDO, J.L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética molecular de microrganismos**. São Paulo: Manole, 1987. p. 393-407.

34. AZEVEDO, J.L. Técnicas utilizadas nos processos biotecnológicos envolvendo fungos. In: [illegible]. Coleção Sociedade Brasileira de Botânica, 1995. p. 77-87.

(35) BALL, C. Protoplast fusion in commercially important microorganisms. In: L.S. Nisbett & D.J. Winstanley (Eds.). **Bioactive Microbial Products**, vol 2, Nova York, Academic Press, 1983. p. 19-32.

36. FERRONI, F.; FERENCZY, L. (Eds.). **Fungal protoplasts**. Nova York: Marcel Dekker, 1985.

37. CARRAO, [illegible]; AZEVEDO, J.L.; SUDICKY, [illegible]; CAMPBELL, P. Methods for [illegible] fusion products in [illegible] and Saccharomyces cerevisiae. **Revista Brasileira de Genética**, v.5, p.221-226, 1982.

38. PUZZI-RANNER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Técnicas eletroforéticas para separação de cromossomos de microrganismos**. Piracicaba: FAEQ, 1989.

39. AZEVEDO, J.L.; PUZZI-RANNER, A.A. Melhoramento de fungos de importância na agricultura. In: MIRA, L.S.; VALA, A.R.S.; NOVAES, M.C.; SANO, L.; SANTOS, A.C.; (Coord.). **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos**. Jaguariúna: Ed. EMBRAPA, p. 323-356, 2002.

(40) [illegible], B. Genes VII. Porto Alegre: Artmed Ed., 20[illegible]

43 HERSHEY, A.D.; ROTMAN, B. Genetic recombination between host-range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacterial cross. Genetics, v.34, p.44-71, 1949.

44 AZEVEDO, J.L. Engenharia genética no controle biológico de insetos. In: ALVES, S.B. (Coord.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1996.

44 AZEVEDO, J.L.; FUNCARO, M.H.P.; VIEIRA, M.C. Transgenicos e evolução dirigida. História, ciência e saúde-Manguinhos, v.7, p.451-464, 2000.

44 PERL, N.; M.H. Plasmids other than F. In: STREPS, F.A.; ASBIN, R.E. (Eds.). Modern microbial genetics. New York: Wiley-Liss, 1991. p.23-55.

45 JINKS, J.L. Extrachromosomal inheritance. New Jersey: Prentice-Hall, 1964.

46 ROSATO, Y.B.; AZEVEDO, J.L. A compact variant of cytoplasmatic origin in Aspergillus nidulans. Transactions of the British Mycological Society, v.75, p.313-315, 1980.

47 ROSATO, Y.B.; AZEVEDO, J.L. Nuclear instability of a compact mutant of Aspergillus nidulans. Revista Brasileira de Genética, v.10, p.425-433, 1987.

48 AZEVEDO, J.L. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of Aspergillus nidulans. Genetica Research, Cambridge, v.26, p.55-61, 1975.

49 BALL, C.; AZEVEDO, J.L. Genetic instability in parasexual fungi. In: MACDONALD, K.D. (Ed.). Second International Symposium of Genetics of industrial Microorganisms. New York: Academic Press, 1976. p.243-251.

50 NEWMEYER, D.; TAYLOR, C.W. A pericentric inversion in Neurospora with unstable duplication progeny. Genetics, v.46, p.737-741, 1967.

4 ELEMENTOS DE ENGENHARIA GENÉTICA

Ana Clara G. Schenberg

4.1 Introdução

O surgimento da Engenharia Genética, na década de 70, foi uma decorrência natural da grande quantidade de conhecimentos que vinham se acumulando na área de Biologia Molecular, envolvendo principalmente as bactérias e seus vírus. Entretanto, em contraste com os demais progressos verificados nesta área, o advento da Engenharia Genética teve um impacto incontestável sobre a Biotecnologia. Hoje, o homem pode intervir diretamente sobre os comandos da vida: é possível programar geneticamente os organismos vivos, não apenas para a superprodução de algum metabólito, mas, ainda, de substâncias que só são normalmente produzidas por outros organismos. Pela facilidade de manipulação que proporcionam, os microrganismos foram os primeiros a serem empregados como hospedeiros da informação genética heterólogа. Em princípio, qualquer proteína pode assim vir a ser produzida em fermentações industriais, desde que o gene que a codifica seja enxertado num microrganismo, ou em outras palavras, clonado, e passe a ser por ele expressado. De crucial importância é a possibilidade que a nova tecnologia trouxe de amplificar seqüências individuais de DNA: a clonagem de um dado fragmento de DNA permite que, partindo-se de apenas uma molécula, sejam produzidas quantidades ilimitadas desta mesma molécula. Depois que um fragmento de DNA tiver sido assim isolado e amplificado, as suas propriedades podem ser caracterizadas e a sua seqüência de nucleotídeos determinada com precisão, o que proporcionou um progresso vertiginoso do conhecimento básico. Por outro lado, a relevância biotecnológica decorre do fato de que a síntese de proteínas estrangeiras pelos microrganismos leva a uma importante redução dos custos de produção. Para citar apenas um exem-

[illegible]

[illegible]

[illegible]

na célula hospedeira

[illegible] do na [illegible]

passos para uma experiência desse tipo

[illegible]

2. É o elemento transportador de genes, o vetor genético, que, ao ser multiplicado pela célula hospedeira, possibilitará que o gene estranho que transporta também o seja.

3. Um meio de introduzir o vetor numa célula viva, capaz de multiplicá-lo.

4. Uma maneira de selecionar, dentre uma grande população de células, apenas aquelas que tiverem efetivamente incorporado o DNA recombinante.

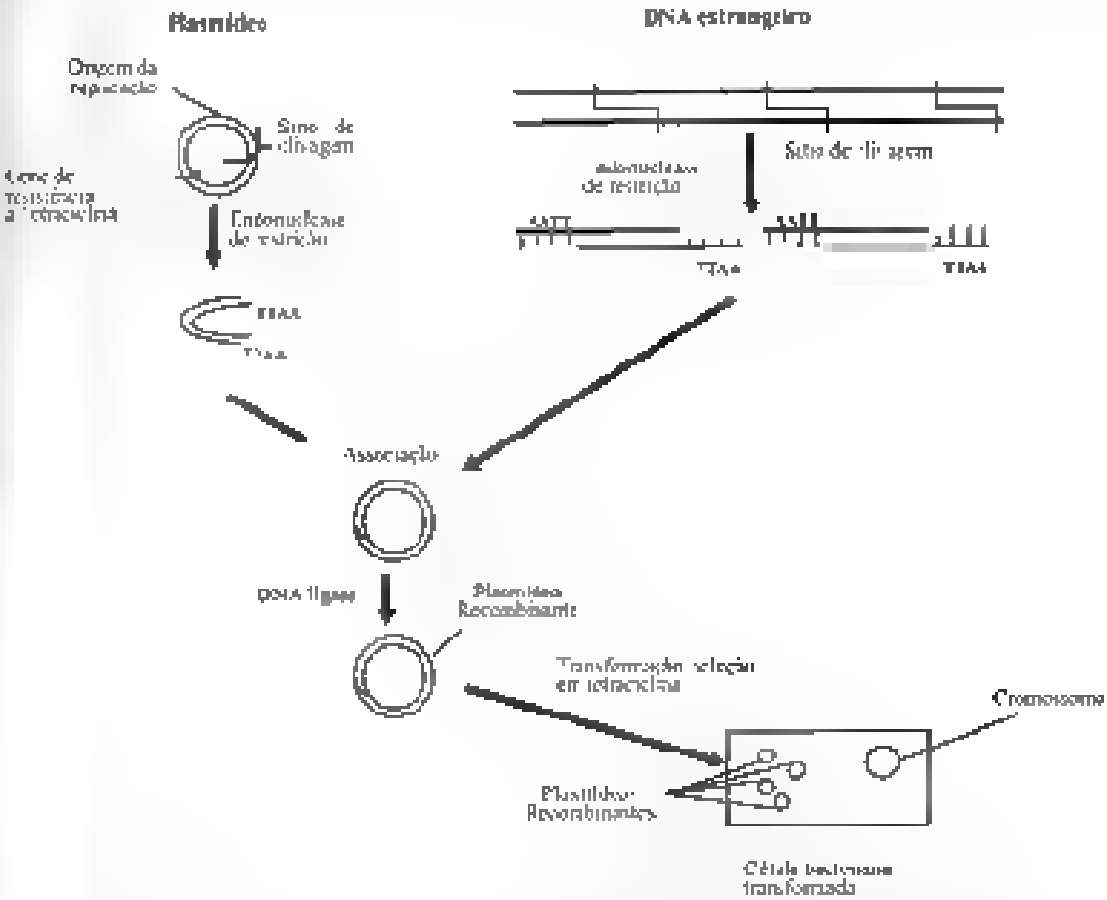


Figura 4.1 – Esquema geral de um experimento de engenharia genética. Inicia-se pelo preparo do vetor e do fragmento de DNA de dupla fita que, posteriormente, o vetor ativado por tratamento com uma endonuclease de restrição para a qual apresenta um único sítio de clivagem, originando uma molécula de DNA linear. Nesta, a sequência de DNA que se deseja clonar é fragmentada por meios enzimáticos, de maneira tal que as extremidades coesivas que correspondem aos sítios de clivagem se mantenham. Em seguida, as duas preparações de DNA são misturadas num mesmo tubo ao qual se adiciona a enzima DNA ligase, o que resulta na formação de moléculas circulares recombinantes, compostas do DNA do vetor e de um fragmento do DNA de origem. Essa preparação é então usada para transformar uma cepa de bactéria sensível ao antibiótico tetraciclina, para o qual o vetor confere resistência, de maneira somente em presença de tetraciclina, somente crescerão as células que contiverem o vetor. Ao se multiplicarem essas células, originam uma população de células que, todas elas, são portadoras do DNA recombinante.

4.2 – Enzimas de restrição: as tesouras moleculares que cortam a molécula de DNA em pontos específicos

A construção de DNA recombinante requer que seja possível cortar as moléculas de DNA de modo preciso e reproduzível. Além de ser necessário cortar o vector num único ponto específico onde será inserido o DNA estranho, é imprescindível que todas as moléculas do vector sejam cortadas exactamente na mesma posição. Felizmente, não se pode realizar esse tipo de construção através da clivagem aleatória do DNA. Isso é impossível. Na verdade, a Engenharia Genética só se tornou possível após a descoberta de uma classe especial de enzimas, as enzimas de restrição, que renderam o Prémio Nobel a W. Arber, H. Smith e D. Nathans em 1978.

A descoberta das enzimas de restrição foi consequência da teoria de Manuel Luria e Max Delbrück, que havia demonstrado a capacidade que algumas cepas da bactéria *E. coli* apresentavam de se proteger da infecção por bacteriófagos, ou seja, para a maioria dos vírus de bactérias, o mecanismo de defesa da bactéria consiste na produção pela bactéria de uma enzima capaz de degradar o DNA viral invasor. O DNA próprio da bactéria fica protegido do ataque pela enzima de restrição porque, ao mesmo tempo em que produz a enzima de restrição, a bactéria também produz uma enzima de modificação, pela ação da qual são introduzidos grupos metila a algumas das bases que compõem a sequência de DNA que é reconhecida pela enzima de restrição em questão. Uma vez metilada, essa sequência deixa de ser reconhecida pela enzima de restrição. Assim, para uma determinada enzima de restrição existe uma enzima de modificação correspondente, e ambas formam o sistema de restrição-modificação.

As enzimas de restrição são utilizadas por muitas bactérias, sendo todas as espécies de bactérias sendo conhecida uma espécie bacteriana que não produz nem de uma enzima de restrição. Mas as enzimas são encontradas em organismos eucariotas. Essa falta de enzimas de restrição de Tipo I e Tipo II tem sido de grande importância para o desenvolvimento da Engenharia Genética. As enzimas de restrição de Tipo I não têm sido muito usadas na Engenharia Genética. Assim, daqui por diante, quando falarmos em enzimas de restrição estaremos nos referindo àquelas de Tipo II.

As enzimas de restrição são endonucleases que reconhecem sequências específicas de nucleótidos na molécula de DNA e cortam as duas cadeias de DNA num ponto dentro dessa sequência. Uma determinada enzima de restrição reconhece a sequência específica e corta aquela sequência particular que reconhece. É essa

especificidade que faz das enzimas de restrição instrumentos tão importantes em Engenharia Genética. Assim, por exemplo, a enzima de restrição chamada *Eco*RI, produzida pela bactéria *E. coli*, só corta o DNA somente quando encontra a sequência de bases GAATTC. Por sua vez, a enzima de restrição *Pst*I, produzida pela bactéria *P. vulgaris*, corta o DNA quando encontra uma sequência bem específica: CTGCAG. A maioria das enzimas de restrição reconhece sequências assimétricas, mas há também as que reconhecem sequências de 4 a 12 nucleotídeos.

Admitindo que os 4 nucleotídeos ocorrem com a mesma frequência, a sequência de DNA calculada que mostra cada sequência de 4 pares de bases ocorrerá em média a cada 256 bp ($4^4 = 256$), enquanto uma de 6 bp ocorrerá a cada 4.096 bp da molécula. Entretanto, como a distribuição de sítios de reconhecimento para uma determinada região do DNA pode ser bastante mais ou menos frequente do que a média esta, as moléculas fragmentadas por uma enzima de restrição podem ainda ser separadas umas das outras com base no seu tamanho, através de eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida. A partir desses dados, é possível construir o que se chama de *mapa de restrição*, o que envolve a determinação da ordem e da distância de cada fragmento na molécula de DNA original.

As sequências de reconhecimento do DNA apresentam uma simetria rotacional. Em geral, a sequência de reconhecimento consiste em palíndromo, isto é, ler a mesma sequência se lida da esquerda para a direita e da direita para a esquerda, ou em termos de DNA, se ambas são lidas na direção 5' para 3' ou ambas são lidas na direção 3' para 5'. As sequências de reconhecimento de algumas enzimas de restrição estão apresentadas na Tabela 4.

A primeira enzima de restrição foi isolada em 1970 e hoje já se conhecem mais de 2.500, isoladas a partir de uma vasta gama de espécies bacterianas, compreendendo 230 diferentes sequências de reconhecimento. Em muitos casos, duas ou mais enzimas de restrição provenientes de diferentes sistemas reconhecem a mesma sequência de DNA. Essas enzimas são chamadas de isoesquizômeros. Há também casos em que duas enzimas comercialmente aprovisionadas são diferentes enzimas de restrição.

O resultado do corte por essas diferentes enzimas de restrição das enzimas que reconhecem exatamente a mesma sequência de reconhecimento é o mesmo, como no caso *Pst*I e da *Aba*I (ver Tab. 4). Um ponto que se chama de extremidade coesiva ou abrupta nos fragmentos de DNA resultantes da sua ação. Por outro lado, um número considerável de enzimas de restrição corta a dupla fita de maneira a gerar extremidades coesivas nos fragmentos resultantes

Tabela 4.1 [illegible] de escrição. Estão apresentadas algumas endonucleases de restrição e as sequências de DNA que reconhecem. A, T, G e C representam os nucleotídeos de adenina, timina, guanina e citosina respectivamente. As setas indicam o ponto em que a enzima linearizou uma das fitas dentro da sequência de reconhecimento. Note que a escrita 5' 3' é sempre uma que [illegible] da dupla.

ORGANISMO PRODUTOR	NOME DA ENZIMA	SEQUÊNCIA DE RECONHECIMENTO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES
Escherichia coli	*Eco*R	5' G↓AATTC 3' 3' CTTAA↑G 5'	Sequência palindrômica de 6 nucleotídeos. O corte gera extremidades coesivas.
	*Eco*RII	5' ..CC A/T GG.. 3' 3' ..GG T/A CC↑.. 5'	Sequência não palindrômica. O corte gera extremidades coesivas.
Proteus vulgaris	*Pvu*II	5' ..CAG↓CTG 3' 3' GTC↑GAC 5'	O corte gera extremidades abruptas ou cegas.
Arthrobacter luteus	*Alu*I	5' AG↓CT 3' 3' TC↑GA 5'	Sequência de 4 nucleotídeos. Extremidades cegas.
Arthrobacter nicotiana	*Aca*II	5' ..CuPy↓CGPuG.. 3' 3' ..GPuGCPy↑C.. 5'	Qualquer purina (Pu) ou pirimidina (Py) pode estar presente.
Nocardia nimidiscabiarum	*Nci*	5' CC↓GCGCC 3' 3' CCGC↑GCC 5'	Sequência de 8 nucleotídeos, pouco freqüente no DNA de mamíferos.
Providencia stuartii	*Pst*I	5' CTGC A↓G T 3' 3' G↑A C CTC 5'	Extremidades coesivas com extensão de 4 bases simples em 3'.
Bacillus stearothermophilus E7	*Bst*E	5' ..GGTNACC 3' ..CCANTG↑G..5'	Onde N pode ser qualquer purina ou pirimidina. Uma das raras enzimas que produz extensões de mais de 4 bases.

Isso ocorre porque as enzimas não cortam as duas fitas da molécula de DNA topo a topo, mas cortam de um modo "desencontrado" dentro da sequência de reconhecimento, o que produz extremidades de corte dotadas de curtas sequências de fita simples, complementares entre si, como está mostrado para o caso da enzima *Eco*RI na Fig 4.2

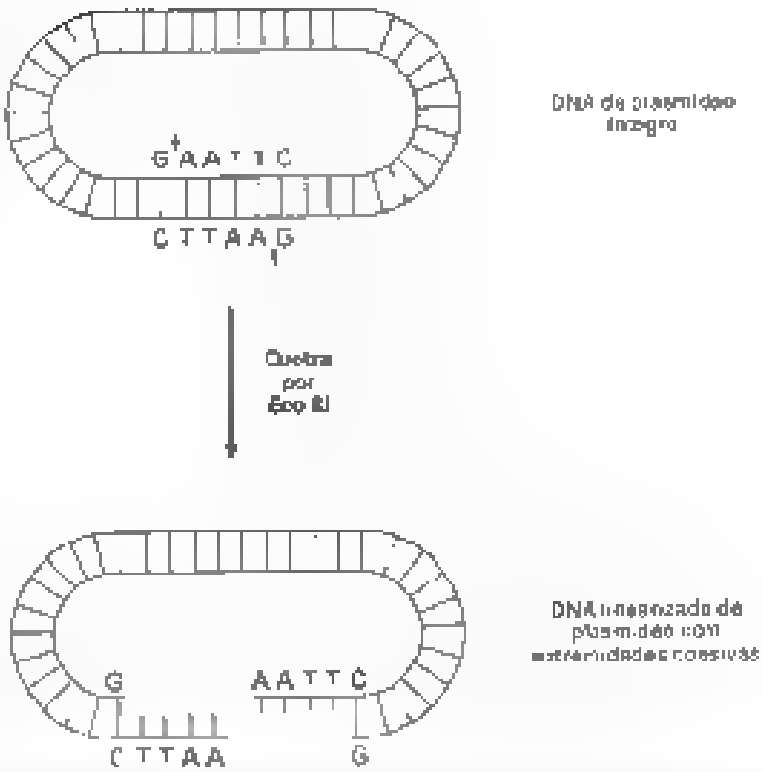


Figura 4.2 [illegible] DNA pela ação de restrição [illegible] RI. Uma molécula de DNA circular de dupla fita [illegible] apenas uma sequência de reconhecimento para a endonuclease de restrição Eco RI, após tratamento com esta enzima, será convertida numa molécula linear com extremidades coesivas do tipo Eco RI.

Assim, por menor que seja a semelhança entre as seqüências de nucleotídeos de duas moléculas de DNA, a enzima de restrição saberá encontrá-la e cortará ambas as moléculas neste ponto. Fragmentos originados a partir de moléculas de DNA diferentes, porém digeridas pela mesma enzima de restrição, quando dotados de extremidades coesivas, irão se associar com grande facilidade através da complementaridade de seqüência, como mostrado na Fig. 4.1.

Todas as enzimas de restrição clivam a ligação fosfodiéster, deixando grupos 5' fosfato (5' P) e 3' hidroxila (3' OH) nos fragmentos resultantes, que constituem exatamente o substrato da enzima *DNA ligase*. Assim, os fragmentos gerados por ação de uma enzima de restrição poderão ser facilmente reunidos através de ligação covalente, por adição da DNA ligase, que catalisa a formação de novas ligações fosfodiéster. Também é possível realizar a ligação entre fragmentos de DNA dotados de extremidades abruptas (como, por exemplo, aquelas geradas pela digestão com a enzima de restrição PvuII), empregando-se a DNA ligase produzida por E. coli infectada pelo bacteriófago T4. O modo de ação da DNA ligase de E. coli e o

da DNA ligase de T4 são muito semelhantes. [illegible] entre elas apenas [illegible] a DNA ligase de [illegible] requer NAD [illegible] T4 requer ATP.

Apesar da facilidade que se obtém para a etapa de ligação, quando se utiliza a mesma enzima de restrição para ambas as espécies de DNA a serem recombinadas, ocorrem também alguns inconvenientes. Como, por exemplo, [illegible] dos fragmentos de DNA estrangeiro [illegible] (Fig. 3.16) [illegible] de DNA estrangeiro [illegible] extremidades 3'-OH do plasmídeo [illegible] DNA estrangeiro [illegible] mais adiante.

4.3 – Vetores genéticos: as moléculas de DNA que veiculam a propagação dos fragmentos de DNA de interesse

Um vetor genético nada mais é que uma molécula de DNA que pode [illegible] de DNA estrangeiro [illegible] para a sua [illegible] célula hospedeira [illegible] de DNA [illegible] estrangeiro [illegible] Entre [illegible] bactérias [illegible] contram-se elementos genéticos [illegible] como plasmídeos e vírus bacteriófagos [illegible] Engenharia Genética [illegible] se mostraram capazes de reprodução após a adição de sequências de DNA estrangeiras ao seu genoma.

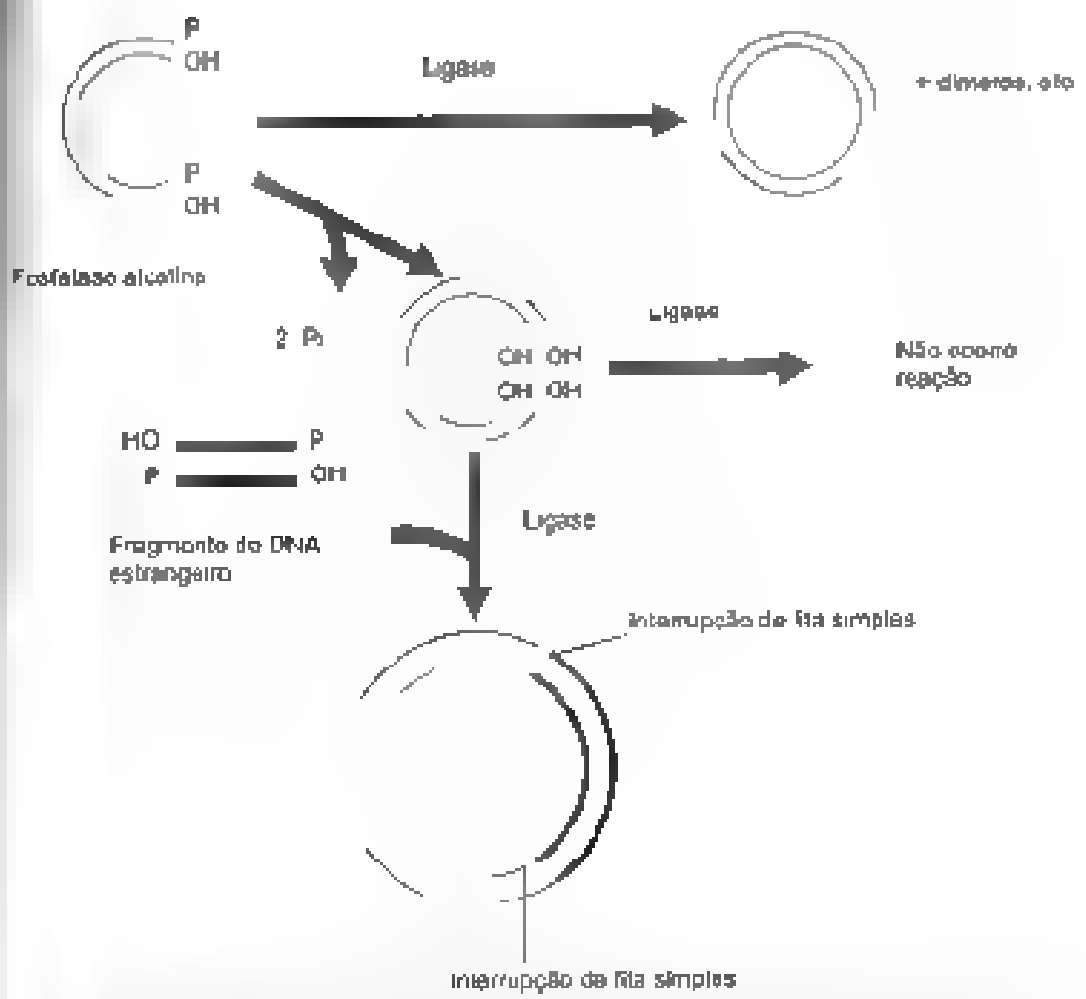


Figura 4.3 Desfosforilação do vetor. Para evitar que se recomponha sem nenhuma inserção de DNA estrangeiro o DNA do plasmídeo recombinado é primeiramente submetido à ação da enzima fosfatase alcalina, de modo que possa ocorrer a inserção do fragmento de DNA estrangeiro e a ligase.

Para que o DNA recombinante possa perpetuar-se entre os descendentes da célula viva que o recebeu inicialmente, ou, em outras palavras, para que o DNA recombinante possa ser *clonado*, é preciso que o sistema enzimático de síntese de DNA (processo de replicação do DNA) desta célula reconheça o novo DNA. Para tanto, é necessária a presença, no vetor, de uma sequência correspondente a uma origem de replicação compatível com o sistema de síntese de DNA da célula hospedeira. Plasmídeos e bacteriófagos contêm tais origens de replicação e apresentam portanto replicação autônoma, independente do cromossomo da célula. Sendo replicados normalmente pela célula hospedeira, haverá cópias de tais replicons em todas as células do clone que esta célula irá gerar ao fim de sucessivas divisões.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

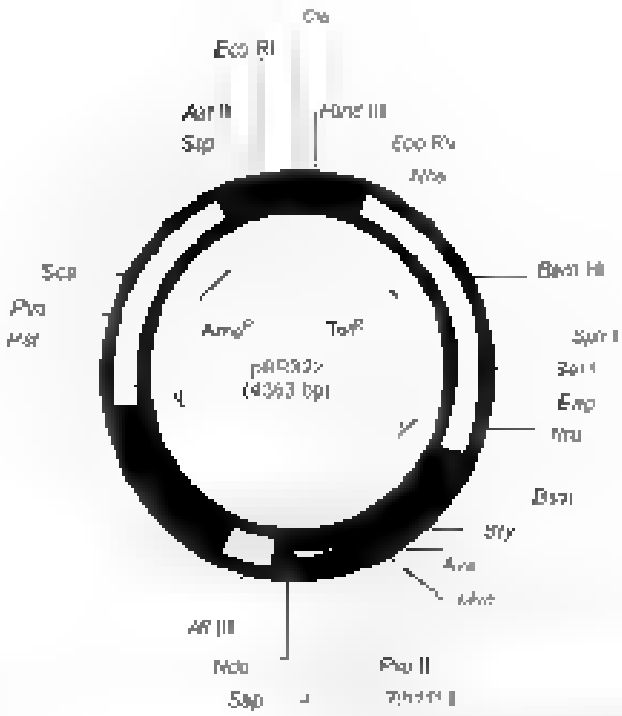


Figura 4.4 Plasmídeo pBR322. Molécula circular de DNA de [illegible]

Como se pode observar pela Fig. 4.4, se utilizarmos o sítio *Pst* para a inserção do DNA estrangeiro, o gene *Amp* ficará inativado e consequentemente a bactéria transformada por este plasmídeo recombinante ficará resistente apenas à tetraciclina, porém continuará sensível à ampicilina (fenótipo Amp^S Tet^R). Como as células não transformadas tem fenótipo Amp^R Tet^R será possível distinguir de imediato num teste em placa de Petri (basta semear as células sobre meio completo adicionado de antibiótico) as células não transformadas das células transformadas pelo plasmídeo recombinante e a coisa mais importante é que as transformadas por um plasmídeo não recombinante (ou seja, em que não ocorreu inserção do fragmento estrangeiro). Essas últimas serão resistentes aos dois antibióticos (Amp^R Tet^R). A possibilidade de tal manipulação insercional acarretando no fenótipo facilmente reconhecível que resulta da presença de dois genes de resistência contendo sítios de contagem diferentes, fez do pBR322 um instrumento extremamente útil em Engenharia Genética. Posteriormente foram construídos plasmídeos ainda mais aperfeiçoados para desempenhar o papel de vetores de E. coli. Assim por exemplo o plasmídeo pUC18 contém um grande número de sítios únicos para diferentes enzimas de

zando plasmideos

[illegible] de tamanho impossível para cabeça da partícula mas pelo menos que seja [illegible] uma quantidade mínima de DNA estrangeiro [illegible] 45 kb [illegible] que fizeram [illegible] de gene [illegible] apresentaram a vantagem de que o DNA pode ser acondicionado em pacotes de tamanho que são [illegible] mais estáveis [illegible] o DNA [illegible] por período de tempo mais longo. Existem ainda vários outros vetores derivados de [illegible] e de bactérias [illegible] capacidade [illegible] de fragmentos de DNA de [illegible] [illegible] caso do fago M13 [illegible] porque [illegible] etapas de manipulação genética. Assim por exemplo [illegible] DNA [illegible] preparação [illegible] DNA [illegible]

No caso de organismos mais [illegible] são os plasmídeos [illegible] por exemplo [illegible] de 2 μm da levedura [illegible] qual se obtém a origem de replicação para a construção de muitos vetores da levedura. Para os organismos [illegible] como vetores [illegible] no caso dos vírus de mamíferos e de insetos.

Também [illegible] vetores [illegible] que obtêm origens de replicação e marcadores de selecção [illegible] sistemas hospedeiros diferentes. Na verdade a maior [illegible] vetores construídos [illegible] diferentes [illegible] capazes de transformar [illegible] quando a bactéria [illegible] interessante porque pode ser que seja apresentada [illegible] hospedeiros. Assim por exemplo embora a levedura [illegible] seja um [illegible] alguns [illegible] DNA plasmídia e que se pode transformar com grande facilidade quando se utiliza um vetor bifuncional.

Quando se trabalha com genomas de eucariotas superiores é necessário clonar fragmentos grandes de DNA. Para a [illegible] fragmentos [illegible] de [illegible] de [illegible] chamado YAC (Yeast Artificial Chromosome) que [illegible] capaz de aceitar insertos de [illegible] kb ou seja duas vezes mais DNA do que [illegible] plasmídeos [illegible] (YAC) [illegible] tudo [illegible] um verdadeiro [illegible] de replicação [illegible] 2 [illegible] além dos genes marcadores [illegible] estabilidade [illegible] estável após a inserção de fragmentos grandes.

Em resumo são as seguintes as características que deve ter o plasmídeo para ser [illegible] como vetor de clonagem:

a) Ter baixo peso molecular

Permite que o vetor seja facilmente isolado intacto

b) Apresentar pelo menos um sítio único para uma determinada enzima de restrição (sítio de clonagem).

Permite que o vetor seja clivado num só ponto, onde será inserido o DNA estrangeiro. Evidentemente, a presença de vários sítios únicos para diferentes enzimas de restrição é altamente desejável.

c) Ser portador de uma origem de replicação compatível com o sistema hospedeiro.

Permite que o vetor se perpetue entre a descendência da célula inicialmente transformada, originando um clone molecular.

d) Conter pelo menos um gene marcador

Permite a seleção dos clones transformantes dentre um grande número de células submetidas ao processo de transformação.

e) Ter controle relaxado de replicação

Permite que o DNA do plasmídeo seja amplificado, possibilitando a obtenção de quantidades ainda mais significativas do gene estrangeiro.

f) Não ser um plasmídeo conjugativo.

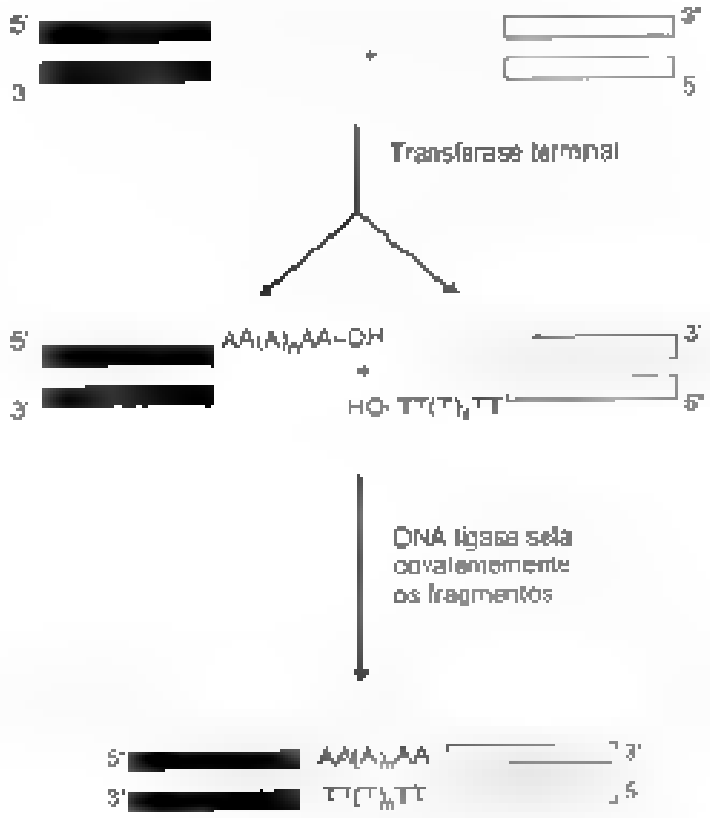
Trata-se de uma medida de segurança visando evitar a disseminação do DNA recombinante fora do laboratório.

4.4 Construção da molécula de DNA recombinante: diferentes estratégias

Há casos em que não é possível empregar enzimas de restrição para a clonagem. O principal problema advém do fato de que pode haver sítios suscetíveis à ação da enzima dentro da seqüência gênica que se quer clonar, sendo portanto grande a probabilidade de se incorrer na inativação do gene. Para contornar esse problema, procede-se à fragmentação mecânica do DNA, que gera quebras ao acaso, garantindo que pelo menos algumas das moléculas não sejam quebradas dentro do gene de interesse. Essa coleção de fragmentos aleatórios é mais representativa do genoma e essa abordagem foi portanto bastante utilizada para a construção de bibliotecas genômicas dos mais diversos organismos. Entretanto, não é evidentemente possível obter extremidades coesivas através desse procedimento. Além disso, o emprego, seja de genes sintéticos, seja de cDNA (veremos adiante) tampouco fornece extremidades coesivas.

Nesses casos, uma alternativa consiste no emprego da enzima transferase terminal. Diferentemente das demais DNA-polimerases, a transferase ter-

[illegible] tal, encontrada em timo de vitela, tem a capacidade de adicionar nucleotídeos às extremidades 3'OH das cadeias de DNA sem necessitar de uma fita de DNA-molde. Essa enzima foi portanto muito utilizada em Engenharia Genética. Por esse procedimento, chamado de método das extensões homopolímeras, pode-se adicionar a cerca de 100 resíduos de um determinado nucleotídeo (por exemplo, dATP) às extremidades do vetor e, por outro lado, cerca de 100 resíduos do nucleotídeo complementar (no caso, dTTP) às extremidades do DNA a ser inserido neste vetor, de tal forma que, quando estas moléculas forem colocadas em presença, possam emparelhar-se através de suas extremidades complementares (Fig. [illegible]).



[illegible]

não poderá se recircularizar sem inserção

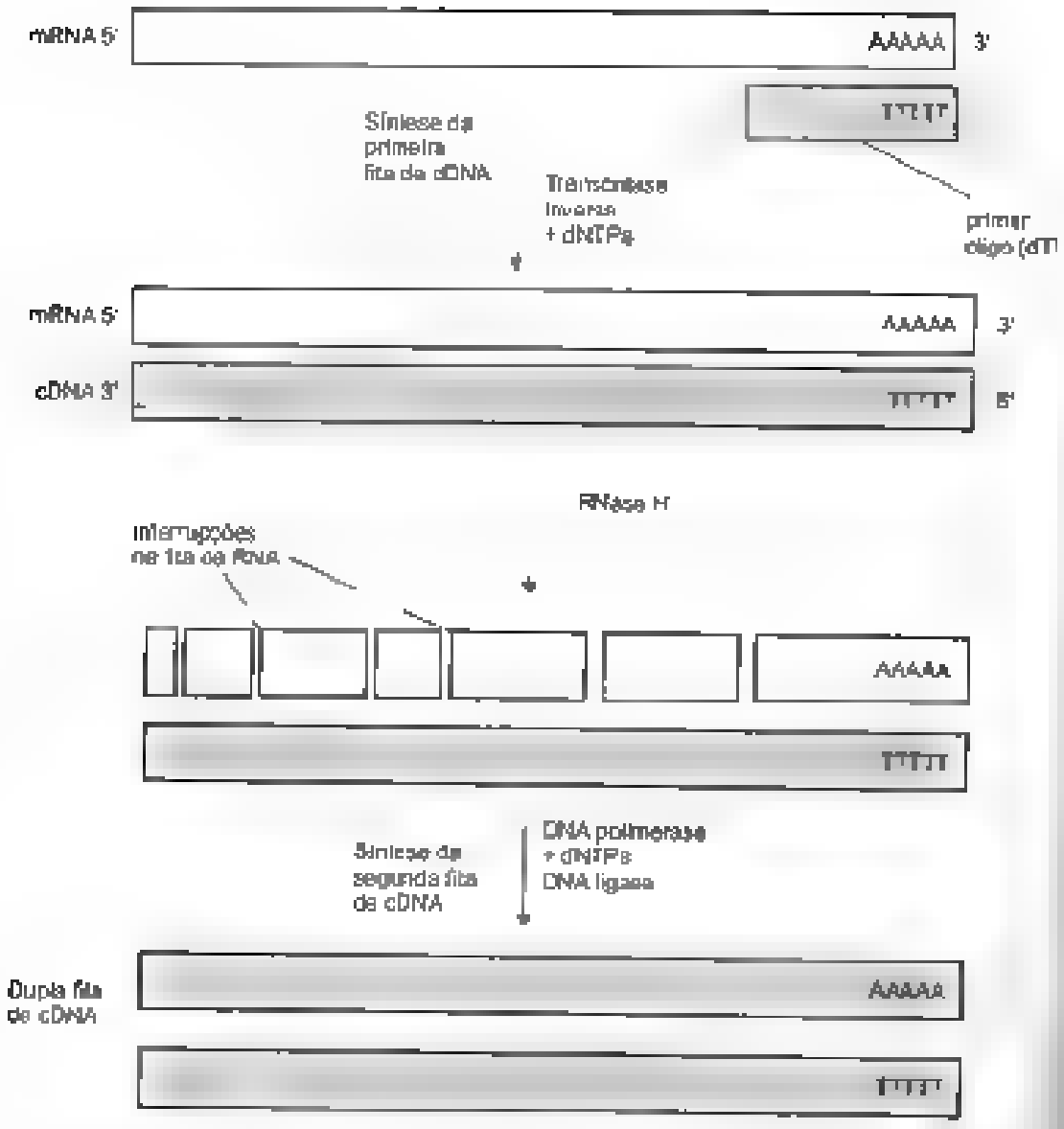


Figura 4.6 Obtenção de DNA [illegible] cDNA a partir do mRNA eucariótico que [illegible] normalmente uma extensão [illegible] o mRNA por oligonucleotídeo [illegible] oligo dT que se hibrida [illegible] como primer para a enzima transcriptase inversa [illegible] fita de DNA [illegible] da molécula. [illegible] RNase H [illegible] DNA polimerase [illegible] DNA ligase [illegible] DNA polimerase [illegible] por moldes [illegible] DNA ligase [illegible] qualquer interrupção remanescente.

Recentemente, foi descoberta uma nova técnica de síntese de DNA *in vitro*, que permite amplificar diretamente uma determinada região do genoma. Trata-se da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que teve um impacto formidável em Biologia Molecular. Para aplicar a PCR, é necessário o

[illegible] as seguintes 2 [illegible] que [illegible] a sequência de DNA [illegible] para poder [illegible] a síntese [illegible] de polimerização [illegible] primers. A primer [illegible] DNA polimerase [illegible] de DNA [illegible] o grande vantagem [illegible] utilizam dos primers [illegible] sintetizada pela DNA polimerase a partir de DNA [illegible] a [illegible] DNA [illegible] apenas [illegible] procedimento é bastante simples [illegible] de DNA que [illegible] gerar [illegible] da PCR envolve o seguinte

1. Desnaturação [illegible] de DNA
2. Resfriamento [illegible] para [illegible] os primers [illegible] DNA
3. Extensão dos primers por ação da DNA polimerase

A grande vantagem da DNA [illegible] possibilidade de se repetir [illegible] vezes, buscando [illegible] de DNA [illegible] de primers. [illegible] de interesse [illegible] DNA [illegible] PCR pode ser [illegible] de DNA de até [illegible] pares de bases.

A técnica da PCR [illegible] DNA [illegible] que permite que se produzam [illegible] DNA [illegible] dos primers [illegible] PCR. A [illegible] de DNA [illegible] DNA [illegible] DNA [illegible] DNA [illegible] DNA [illegible] PCR [illegible] quais se [illegible] bem [illegible]

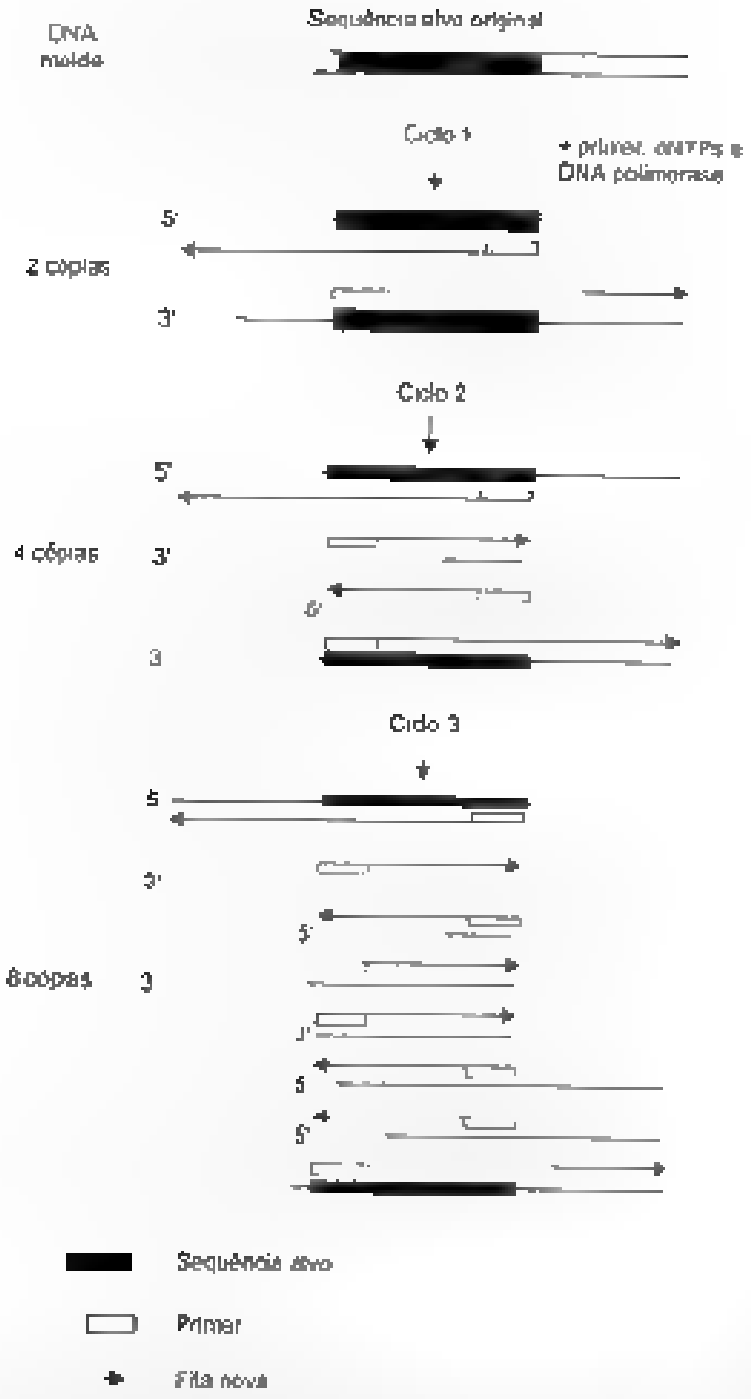


Figura 4.7 A reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA-molde a ser amplificada (para solda) é inicialmente desnaturado por elevação da temperatura. Após a separação das 2 fitas do DNA-molde, a DNA-polimerase sintetiza novas fitas (setas duplas pretas), a partir de cada um dos primers (setas duplas e curvas). Após o ciclo de 1 min, o DNA-molde e os fragmentos de DNA. Deve-se notar que, em cada ciclo, a síntese de agulhas é [illegible] que a seq. alvo, relativa ao longo dos ciclos sucessivos e não contém a amplificação molecular [illegible] apenas da sequência-alvo, ou seja, da sequência contida entre os 2 primers.

de doenças genéticas. Além disso, a alta sensibilidade da PCR permitiu o desenvolvimento do "DNA fingerprinting" (impressão digital do DNA), uma técnica de alto poder de resolução que possibilita a identificação de indivíduos (determinação de paternidade, determinação de suspeitos em casos policiais) a partir de amostras diminutas do seu DNA. A sensibilidade da PCR é tal, que ela permitiu a amplificação e clonagem de DNA obtido de múmias humanas e de plantas e animais extintos. A única exigência da PCR é a disponibilidade dos primers adequados, e preciso saber quais são as sequências vizinhas à região de interesse que se deseja amplificar. Entretanto, quando se dispõe de um fragmento de DNA qualquer inserido num vetor conhecido, é óbvio que essa dificuldade desaparece, já que se podem utilizar como primers as seqüências contíguas do próprio vetor.

4.5 Expressão da informação genética heteróloga

Com os desenvolvimentos da Engenharia Genética, é hoje possível expressar qualquer gene em qualquer organismo hospedeiro, desde bactérias, leveduras, fungos filamentosos e insetos, até plantas e mamíferos transgênicos. Vetores especializados tiveram entretanto de ser desenvolvidos para não apenas transformar eficientemente, mas também fornecer as condições necessárias para a expressão do DNA clonado em cada um desses tipos celulares.

A síntese de uma proteína funcional a partir do gene clonado depende de vários passos metabólicos, que deverão ser realizados pela célula hospedeira.

1) Transcrição do gene, originando o mRNA.

2) Processamento ("splicing") do mRNA, que irá remover as regiões correspondentes aos íntrons.

3) Tradução do mRNA em proteína.

4) Processamento pós-traducional: há proteínas que, uma vez sintetizadas, necessitam ainda sofrer modificações para poderem ter atividade biológica.

5) Além disso, uma vez pronta, é preciso que a proteína heteróloga não seja degradada pela célula hospedeira.

Evidentemente, uma falha em qualquer um desses passos resultará na ausência do produto do gene clonado.

Para garantir a expressão do gene clonado, foram desenvolvidos vetores especiais, chamados *de vetores de expressão*, que são portadores dos diversos elementos genéticos necessários às etapas de transcrição e de tradução que a célula hospedeira deverá realizar. É importante ressaltar que diferentes sistemas hospedeiros exigem elementos específicos. Vamos aqui nos limitar a descrever os requerimentos específicos da escala bacteriana. Na Fig. 4.8 está representado um modelo de vetor de expressão para *E. coli*.

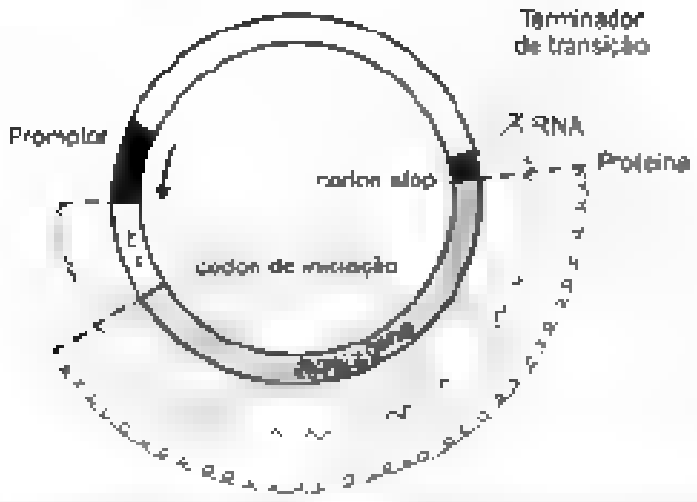


Figura 4.8

que hospeda este plasmídeo recombinante

Para que ocorra a transcrição é necessário que o gene clonado esteja intercalado entre um promotor e um determinador de transcrição. As sequências de DNA que são reconhecidas pela RNA-polimerase da célula hospedeira já foram isoladas e diferentes promotores bacterianos, que já foram quanto a sua intensidade e seu modo de ação. Os promotores fortes são aqueles que sustentam uma alta taxa de transcrição e foram isolados de genes cujos produtos são requeridos em altas concentrações para o funcionamento normal da célula. Por sua vez, os promotores fracos, que são de ocorrência menos frequente, foram isolados de genes cujos produtos são substâncias em pequenas quantidades para o funcionamento normal da célula. Dependendo da finalidade de clonagem, às vezes pode ser interessante utilizar um promotor fraco, como por exemplo no caso de proteínas tóxicas para a célula hospedeira. Essa estratégia evita a ocorrência de poder matar a bactéria portadora do gene clonado antes de haver a produção em massa de cópias para se obter a proteína marca do gene clonado. Para essa finalidade são muito utilizados vetores contendo um promotor específico que permite um controle mais estrito da expressão. Em E. coli a regulação da transcrição pode ocorrer seja por indução, seja por repressão. O gene indutível é aquele cuja transcrição ocorre em presença do indutor, geralmente o indutor consistirá do substrato da enzima codificada pelo gene em questão. Em contrapartida, um gene reprimível é aquele cuja transcrição deixa de ocorrer na presença da substância repressora. Os promotores mais frequentemente utilizados para a expressão em E. coli são o promotor do lac, que controla a transcrição do gene lacZ codificador da enzima β-galactosidase. Esse promotor é induzido por açúcares galactosídeos como o isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG), de modo que ao se adicionar IPTG ao meio de cultura o promotor lac entra em ação

nagem do cDNA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

4.6 - Isolamento de genes clonado

[illegible]

4.6. Métodos geneticos

[illegible]

4.6.2 – Métodos imunoquímicos

[illegible]

[illegible] respondente

[illegible]

Foram portanto desenvolvidos métodos alternativos de marcação, dentre os quais se destacam aqueles que se baseiam na reação entre biotina e avidina, esta última acoplada a um marcador de fluorescência. Uma vez identificado o clone que contém o DNA desejado, volta-se à placa original da qual foi obtido o filtro carimbado, para se recuperar as células vivas.

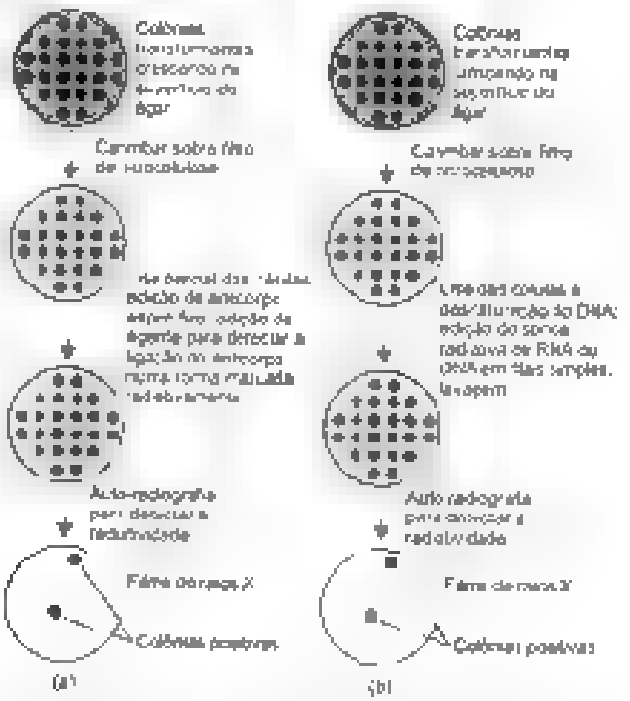


Figura 4.9 Identificação da seqüência recombinante: a) identificação por meio de anticorpo específico: o clone recombinante é identificado por estar produzindo a proteína codificada pelo gene clonado. b) identificação por meio de sonda genética: o clone recombinante é identificado por conter o DNA complementar à sonda.

É possível ter uma sonda genética disponível nos seguintes casos:

a) Quando se isolou o RNA correspondente ao gene em questão (tRNA, rRNA ou mRNA). Assim, por exemplo, o 1º gene eucariótico a ser isolado foi o gene da globina de coelho, a partir do isolamento do seu mRNA.[5] O isolamento do mRNA da globina a partir de eritrócitos é extremamente fácil, tendo, uma vez que os eritrócitos são células especializadas, que só produzem globina. Essa não é entretanto a situação que se verifica para a grande maioria das proteínas. Como alternativa, pode-se obter o mRNA através de sua capacida

de de dirigir a síntese do produto do gene desejado num sistema de tradução [illegible] mas está ab[illegible]ragem já é mais sofisticada. Hoje em dia graças aos de[illegible] avanços na área de síntese e sequenciamento de [illegible] por [illegible] cultura e transformação genética de [illegible] mas de mamíferos, além da PCR, tor[illegible]nou-se bem mais simples e rápido obter cDNAs completos, assim como clonar cDNAs a partir de mRNAs pouco abundantes na célula de origem. Uma vez tendo em mãos o mRNA, este pode evidentemente ser utilizado como sonda para detectar o seu gene.

b) Quando se trata de um gene cujo produto é de grande interesse, é possível empregar uma sonda heteróloga, ou seja, o DNA de outro organismo. Assim, por exemplo, o gene da actina de S. cerevisiae foi isolado empregando-se como sonda um DNA de actina de [illegible]

c) Quando já se tiver algumas informações sobre a sequência da proteína codificada pelo gene de interesse, é possível sintetizar oligonucleotídeos curtos, correspondendo uma pequena sequência do gene e este oligonucleotídeo será empregado como sonda. Assim, no caso do interferon, a partir da levedura, já se dispunha de tal [illegible] de uma sequência de cDNA de HLA que pôde ser utilizada como sonda para o isolamento do gene CYC1[illegible]

Quando se fala em sonda genética, como [illegible] mais acima, pode-se [illegible] a hibridação do tipo Southern. Nesse método, a hibridação se dá entre um DNA [illegible] e um [illegible] específicos. Esse DNA é primeiramente digerido por uma ou mais enzimas de restrição, e separadamente se fragmentos resultantes por eletroforese em [illegible] de gel e desnaturam-se os fragmentos [illegible] de transferência para [illegible] de nitrocelulose, que será [illegible] com a sonda marcada. Por meio da autoradiografia [illegible] pode-se [illegible] o fragmento de DNA que corresponde à sonda. A mesma técnica [illegible] pode ser [illegible] RNA. Neste caso, o procedimento é denominado de hibridação do tipo Northern. [illegible] Southern pode ser [illegible] de um determinado gene e transferi-lo para uma determinada situação [illegible]. Para tanto, extrai-se o RNA total da célula em diferentes momentos de seu ciclo de vida ou em diferentes condições de cultivo, ou de diferentes tipos celulares, para a realização do Northern. Se ocorrer hibridação com o DNA do gene clonado, saberemos que ela está havendo transcrição do gene naquele momento. Também as proteínas das células transformadas podem ser separadas por eletroforese para serem em seguida identificadas através de reação com o anticorpo específico. Neste caso, a análise é denominada de *Western*.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

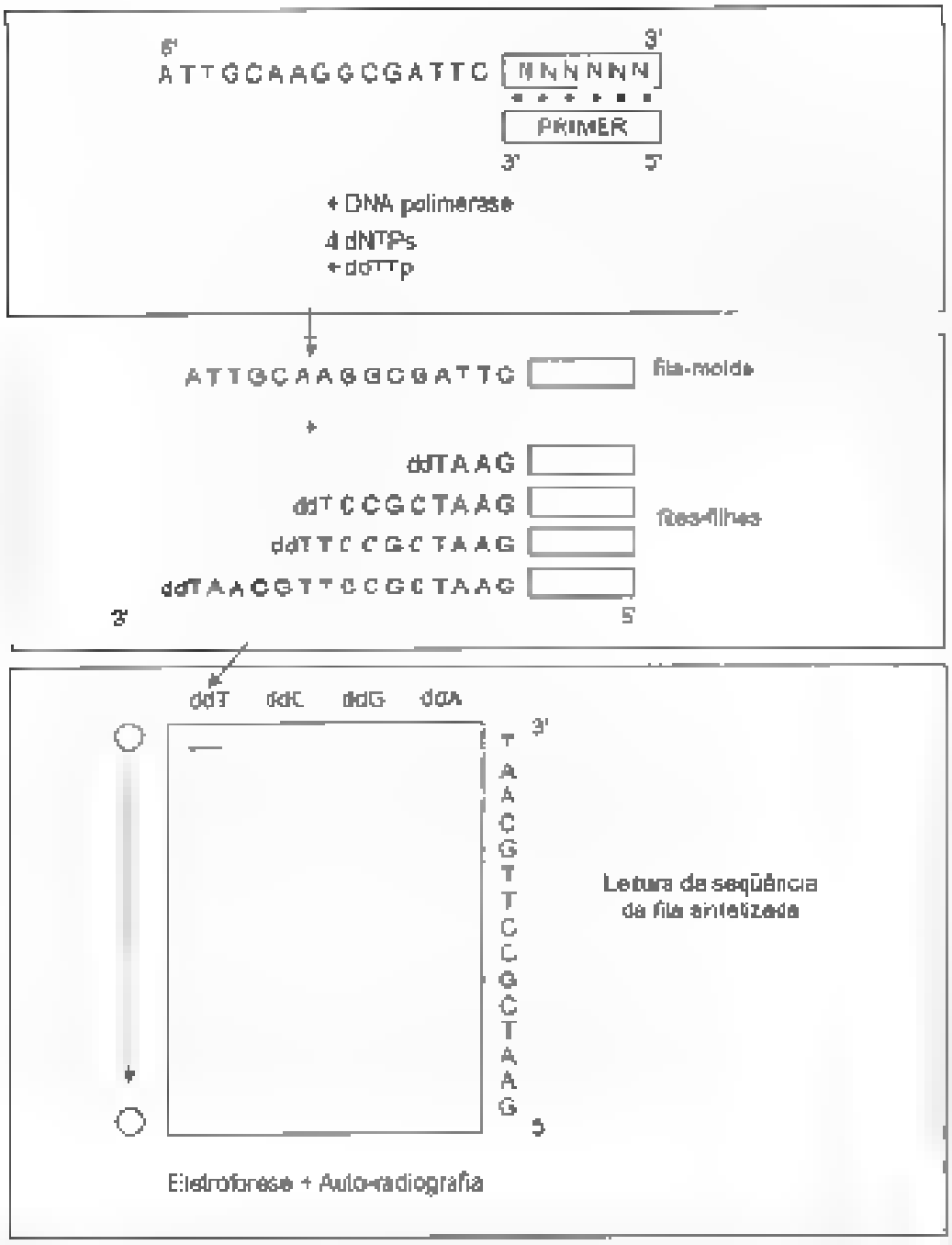


Figura 4.10 Sequenciamento de DNA pelo método enzimático de Sanger. [illegible] fragmento de DNA [illegible] síntese [illegible] da nova fita pela DNA polimerase [illegible] nesta etapa. Cada [illegible] de uma curta sequência com[illegible] ao DNA do plasmídeo [illegible] ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP [illegible] dNTP [illegible] incorporado à fita de DNA [illegible] No passo seguinte, estas 4 preparações são submetidas à eletroforese em gel desnaturante para separar os fragmentos pelo seu tamanho. A autorradiografia do gel mostra os fragmentos [illegible] sequência [illegible] DNA [illegible]

O DNA [illegible] pode também ser [illegible]

4.3 – Transformação genética da célula viva: diferentes sistemas hospedeiros do DNA recombinante

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

4.7.1 Hospedeiros procarióticos

[illegible]

4.7.2 Hospedeiros eucarióticos

[illegible]

4.8 Questões de segurança e preservação ambiental

de laboratório. Assim, por exemplo, foi

de desencadear a sua própria morte[21]

elementos celulares

trada pelo microrganismo

Referências bibliográficas

2004-09. 1972

[illegible] A. [illegible] M. A comparative study of host cellular [illegible] of bacteria and viruses. **J. Bacteriol.** 64:557-569, 1952.

[illegible] A. [illegible] from [illegible] of [illegible] and genera properties. **Mol. Biol.** [illegible]

[illegible] R. [illegible] A. [illegible] R. [illegible] R. A. [illegible] of [illegible] **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** [illegible]

[illegible] **Genética Molecular de Microrganismos** [illegible]

[illegible] **Science** [illegible]

[illegible] **Nature** [illegible]

[illegible] **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** [illegible]

[illegible] *coli*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 79:1830-3, 1982.

[illegible] *coli*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 74:487-91, 19[illegible]

12. ROUGEON, F. KOURILSKY, P. MACH, B. [illegible] **Nucleic Acids Res.** [illegible]

[illegible] *cerevisiae*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 77:3917-16, 1980.

[illegible] **Cell** [illegible]

[illegible] **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 74:[illegible]

[illegible] **Biotechniques** [illegible]

[illegible] **Nature** 298:347-50, 1982.

[illegible] **Ciência & Cultura** [illegible]

[illegible] **Science** [illegible]

[illegible] **Molecular Cloning of Recombinant DNA**. Academic Press, New York, 1977. p.248-69.

2. MOLIN S., KLEMM, P., POULSEN, L., BIEHL, H., CONRADES, K., ANDERSSON, P. Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. **BioTechnology** 5: 315-18, 1987.

2. POULSEN, L.K., ARSEN, N.W., MOLIN, S., ANDERSSON, P. A family of genes encoding a cell-killing function may be conserved in all gram-negative bacteria. **Mol.Microbiol.** 3: 463-72, 1989.

23. JORENZ, M.C., WACKERNAGE, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. **Microbiol. Revs.** 58:563-602, 1994.

Leitura recomendada

WATSON, D. G., GILMAN, M., WITKOWSKI, J., ZOLLER, M. **Recombinant DNA.** 2nd Edition. Scientific American Books. W.H. Freeman and Company. New York, 1992.

OLD, R.W., PRIMROSE, S.B. **Principles of Gene Manipulation: an Introduction to Genetic Engineering.** 4th edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1989.

5 ELEMENTOS DE ENZIMOLOGIA

Bayardo B. Torres

5.1 – Introdução

Uma reação qu m ca pode ser aza isada quanto a sua *termodinamica* a quando é sob o e a. A Termodinamica estuda a viabilidade e a reversibilidade das reações, a partir da análise do conteudo energetico dos estados inicial e final de uma transformação — no caso das reações quimicas, o conteudo energetico dos produtos e reagentes. Nada esclarece porem sobre a velocidade com que a transformação ocorre. Essa informação é dada pela Cinética. Uma reação qu m ca pode ser termodinamicamente viável (isto é, se ocorrer o conteudo energetico dos produtos será menor do que o dos reagentes) mas não se efetuar em determinadas condições (ou seja, ter velocidade igual a zero ou muito próxima de zero). N o parâmetros termodinâmicos os organismos não podem interferir. Como será visto adiante, sua intervenção incide exclusivamente sobre o aspecto cinético, isto é, sobre a velocidade das reações.

Tomando o exemplo simples da conversão irreversivel de uma substância *A* em *B* ($A \rightarrow B$), a *velocidade da reação* (v) será

$$v = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{ou} \quad V = -\frac{d[A]}{dt}$$

A unidade de v é moles por litro por segundo, se [*B*] e [*A*] representarem as concentrações molares de *B* e de *A*.

A ultima equação mostra que a velocidade da reação diminui à medida que a reação prossegue e a concentração de *A* diminui. A velocidade é portanto proporcional à concentração de *A*.

$$v = \frac{d[A]}{dt} = k[A]$$

A constante k é chamada *constante de velocidade* da reação, com unidade de s. Essa é uma reação de *primeira ordem*, já que sua velocidade depende da concentração do reagente com expoente 1.

A maior parte das reações químicas processadas nos organismos são mais complexas, por envolverem pelo menos três moléculas diferentes e por serem geralmente reversíveis. São reações de *segunda ordem*, representadas, por exemplo, por

$$2A \leftrightarrow B + C \quad \text{ou} \quad A + B \leftrightarrow C + D$$

para as quais, pode-se demonstrar, as velocidades de reação serão, respectivamente

$$V = k[A]^2 \quad \text{e} \quad V = k[A][B]$$

Nesses casos, a velocidade da reação é explicada pela *teoria das colisões*. Essa teoria estabelece que, para reagir, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e que a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir um estado reativo, chamado *estado de transição*. Para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como *energia de ativação*. Essa energia é, portanto, a barreira que separa os reagentes dos produtos. A decorrência direta desse modelo é que a velocidade das reações pode ser aumentada pelo menos de três maneiras diferentes: (1) aumentando o número de moléculas em solução, ou seja, sua concentração, como previsto pela equação da velocidade; (2) aumentando o número de choques entre as moléculas; (3) diminuindo a barreira imposta pela energia de ativação.

Em uma população de moléculas, nem todas têm o mesmo conteúdo energético em um dado instante. Algumas têm conteúdo muito pequeno, outras muito grande, e a maioria apresenta um conteúdo médio, característico da temperatura na qual a população se encontra. Quando se eleva a temperatura de um sistema, as moléculas, no seu conjunto, adquirem um conteúdo energético maior [Fig. 5.1 (a)], mas é respeitado o mesmo padrão de distribuição de energia entre elas. Como em um sistema qualquer a velocidade da reação será diretamente proporcional ao número de moléculas com energia igual ou maior do que a energia do estado de transição, o aumento da temperatura de um sistema acarreta uma maior velocidade da reação química [Fig. 5.1 (b)]. Por outro lado, se a energia de ativação necessária para a reação ocorrer for menor, mesmo mantida a temperatura inicial, um número maior de moléculas terá energia maior do que a do estado de transição e estará, portanto, em condições de reagir [Fig. 5.1 (c)]; neste caso, a velocidade de reação também será aumentada.

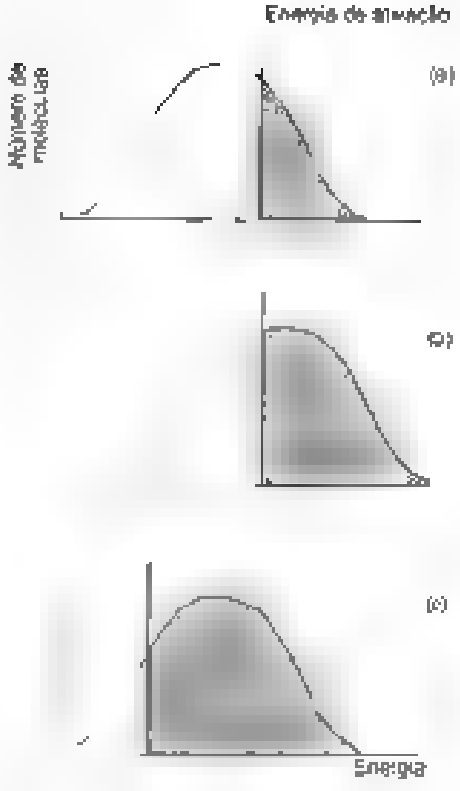


Figura 5.1 Superfícies de distribuição de energia entre as moléculas componentes de um sistema bem-ventilado. (a) Gráfico da energia de ativação e a área sombreada representa a população de moléculas com energia suficiente para reagir. (b) Distribuição de energia em uma dada temperatura. (c) Distribuição de energia em uma temperatura maior do que [illegible]. Distribuição de energia de um sistema na temperatura T, mostrando a alteração provocada no valor da energia de ativação pela ação de um catalisador.

Figura 5.2 Diagrama de coordenada de reação. Os estados de transição são associados à energia de ativação da reação. A [illegible] energia interna e conteúdo energético dos produtos dos reagentes e a energia de ativação ΔG‡.

A redução no valor da energia de ativação pode ser obtida pela presença de *catalisadores*: compostos capazes de aumentar a velocidade da reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo. Podem portanto atuar em quantidades mínimas, ditas *catalíticas*, várias ordens de grandeza menores do que a concentração dos reagentes. O catalisador participa efetivamente da reação, sofrendo alterações de sua estrutura química durante o processo, invariavelmente porém, retorna à sua forma original no final da reação.

O processo pelo qual os catalisadores aceleram uma reação química consiste em criar um novo "caminho" de reação, para o qual a energia de ativação requerida é menor (Fig. 5.2). Um exemplo simples desse novo caminho é mostrado na Fig. 5.3, através da hidrólise de um éster catalisado por íons H^+. A reação consiste no ataque do oxigênio (que tem carga residual negativa), pertencente à molécula de água, ao carbono presente no éster (que tem carga residual positiva, em virtude de sua dupla ligação com o oxigênio). A energia de ativação requerida para atingir o estado de transição é alta. A presença dos íons H^+ cria um caminho alternativo para a reação: o íon H^+ liga-se ao oxigênio presente no éster, aumentando a carga positiva do carbono e tornando-o mais suscetível ao ataque do oxigênio da água. Para esse novo caminho a energia necessária é menor e, portanto, em uma mesma temperatura, mais moléculas poderão reagir e a velocidade da reação será aumentada pela presença de H^+. Segundo modelo semelhante, muitas reações químicas poderão ser aceleradas por íons OH^-, por íons de metais, etc.

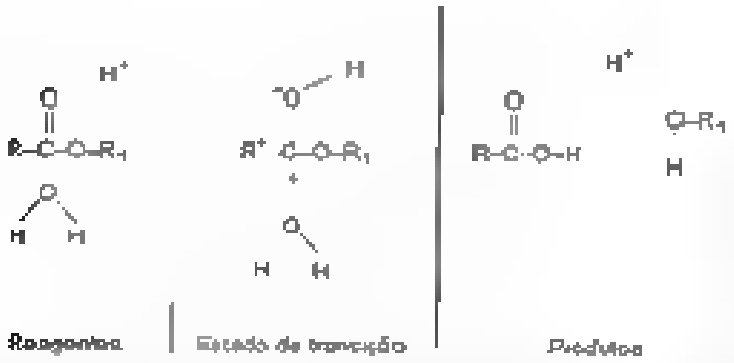


Figura 5.3 Mecanismo da hidrólise de um éster catalisada por H^+. A presença do catalisador facilita a formação do estado de transição, um arranjo de reação que requer energia de ativação menor do que o da reação não catalisada.

[illegible]

[illegible] ces inorgânicos

Além disso, as enzimas apresentam sob [illegible] u ar também está sob rígido controle

[illegible] como a conhecemos

5.2 – Estrutura das enzimas

[illegible]

aminoácidos, algumas incluem em sua estrutura um componente não-protéico, designado *grupo prostético*. São macromoléculas, com peso molecular variando entre cerca de 5 000 a até mais de 1 000.000 de dáltons. Dálton é uma unidade de massa equivalente a 1/12 da massa de um átomo de carbono 12. Com exceção da prolina, os aminoácidos componentes das proteínas (Fig. 5.4) apresentam uma porção comum: um átomo de carbono ligado a uma carboxila, a um grupo amino e a um átomo de hidrogênio. O quarto substituinte do carbono é uma cadeia, chamada grupo R, específica para cada aminoácido. As propriedades particulares de cada aminoácido são dadas, portanto, pelo grupo R.

5.2.1 Estrutura primária

Na molécula protéica, os aminoácidos estão ligados uns aos outros através da ligação peptídica (Fig. 5.5), estabelecida entre o grupo α-carboxila de um aminoácido e o grupo α-amino do aminoácido subsequente, formando uma longa cadeia.

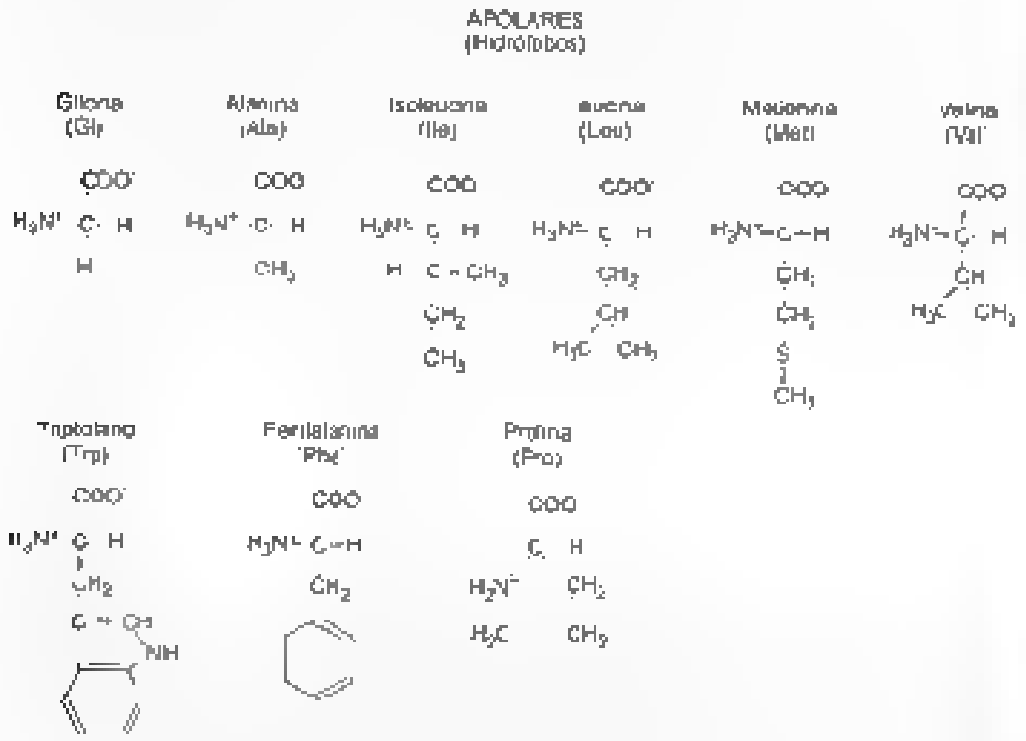
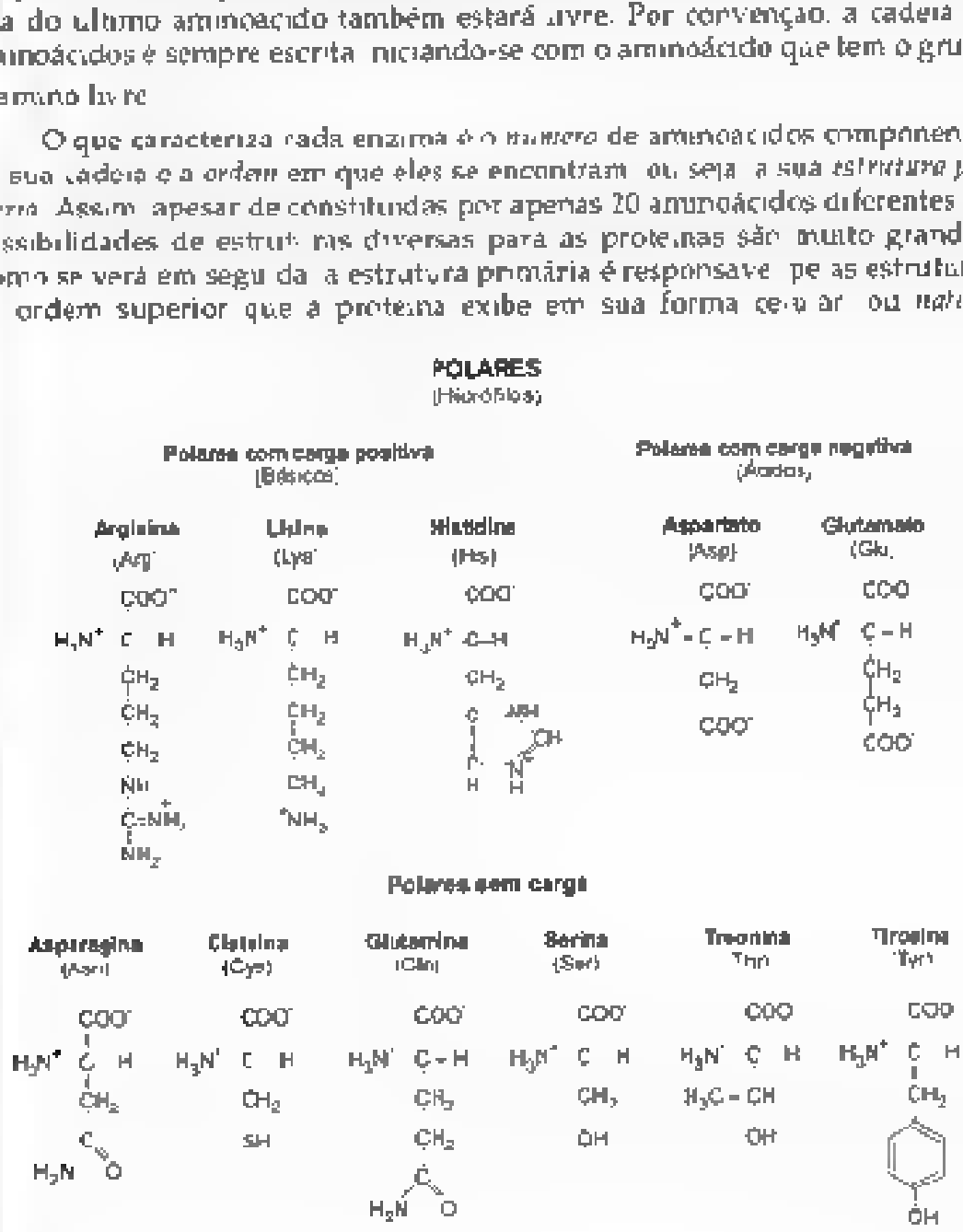


Figura 5.4 Aminoácidos polares: a prolina, com anel, vê-se normalmente encontrada a pH 7; as cadeias dos aminoácidos ácidos (acima) apresentam carga elétrica líquida negativa nesse pH, e aminoácidos básicos, as cadeias (abaixo) carga positiva. Os aminoácidos apolares apresentam um grupo R hidrofóbico. Os aminoácidos polares sem carga elétrica líquida (meio) apresentam carga elétrica total que é igual a zero de todos os aminoácidos está ligada na estrutura, expulsando água do sistema. Aminoácidos não são encontrados em proteínas de qualquer tipo. A prolina é um aminoácido com uma estrutura especial em que não existe grupo amino. É, a rigor, um aminoácido.

Note-se que essa ligação é sempre feita com os grupos α, grupos carboxila e grupos amino presentes no radical R (como no glutamato, aspartato e lisina) jamais participam da ligação peptídica. Portanto, uma cadeia protéica composta por, por exemplo, 150 aminoácidos, terá uma extremidade em que o grupo α-amino do primeiro aminoácido estará livre e outra em que a α-carboxila do último aminoácido também estará livre. Por convenção, a cadeia de aminoácidos é sempre escrita iniciando-se com o aminoácido que tem o grupo α-amino livre.

O que caracteriza cada enzima é o *número* de aminoácidos componentes de sua cadeia e a *ordem* em que eles se encontram, ou seja, a sua *estrutura primária*. Assim, apesar de constituídas por apenas 20 aminoácidos diferentes, as possibilidades de estruturas diversas para as proteínas são muito grandes. Como se verá em seguida, a estrutura primária é responsável pelas estruturas de ordem superior que a proteína exibe em sua forma ceroular, ou *nativa*.



Continuação da Fig. 5

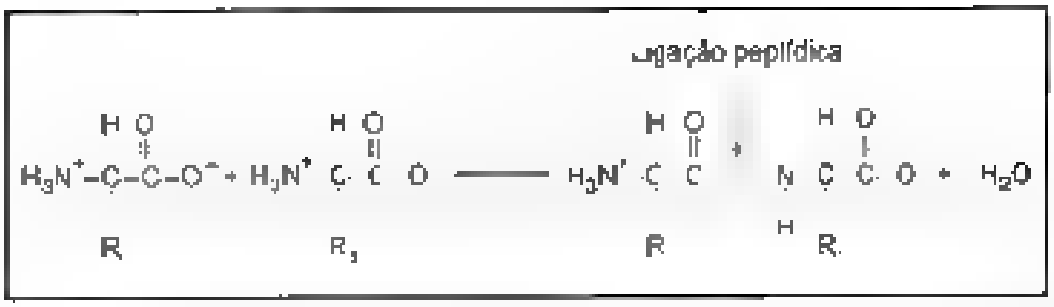
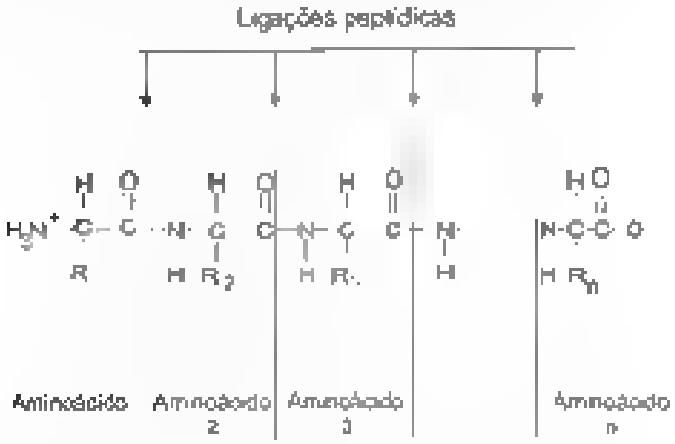


Figura 5.5 Esquema da formação da ligação peptídica. Apresentado pelo lado esquerdo, essa reação ocorre acontecendo, as três letras que [illegible] formação é [illegible] envolvendo [illegible] cada uma delas [illegible] entre proteínas que [illegible] diferentes [illegible] do esquema representa apenas o resultado final do processo.

Note-se que a monotonia da estrutura proteica é apenas aparente. A diversidade dos radicais R e as ligações químicas que ocorrem entre eles farão com que cada tipo de proteína, com sua estrutura primária própria, apresente uma conformação espacial que lhe é peculiar e lhe permite exercer sua função, que é dependente da sua forma. De fato, a cadeia peptídica linear, como esta representada abaixo, não existe em solução.

A cadeia peptídica pode ser, portanto, representada assim:



5.2.2 Estrutura secundária

Dois tipos diferentes de organização regular, chamadas estruturas secundárias, são encontrados nas enzimas. A cadeia peptídica pode ter segmentos organizados em α-hélice. Essa estrutura é formada e estabilizada por pon-

tes de hidrogênio estabelecidas entre o átomo de nitrogênio e o átomo de oxigênio (Fig. 5.6).

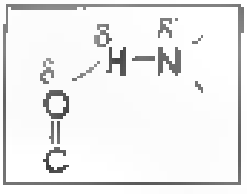


Figura 5.6 Ponte de hidrogênio formada entre os grupos NH e CO de duas ligações peptídicas [illegible] ângulo [illegible] [illegible] a estrutura α-hélice.

Cada ligação peptídica fornece os elementos para a formação da ponte de hidrogênio: um átomo de hidrogênio covalentemente ligado ao nitrogênio e o oxigênio preso ao carbono por uma dupla ligação. Cada ponte de hidrogênio é uma ligação fraca mas, grande número dessas interações confere uma estabilidade à estrutura que mantém. As ligações com átomos do eixo da cadeia protéica não têm ângulos de 180° como o esquema apresentado acima sugere. Os átomos dispõem-se espacialmente como pertencentes a uma hélice com 3,6 aminoácidos por volta de tal forma que a ligação por ponte de hidrogênio é estabelecida entre os átomos constituintes de uma ligação peptídica qualquer e os átomos da quarta ligação peptídica subsequente, que a volta da hélice aproxima da primeira (Fig. 5.7). As pontes de hidrogênio dispõem-se paralelamente ao eixo da hélice e os grupos R projetam-se para o seu exterior.

O segundo tipo de estrutura secundária encontrada nas proteínas é chamada *folha β-pregueada* (Fig. 5.8). Essa estrutura é formada por um arranjo paralelo de dois ou mais segmentos de cadeias peptídicas quase totalmente distendidas e também é mantida por pontes de hidrogênio formadas pelos mesmos elementos que constituem as pontes de hidrogênio da α-hélice. Nesse caso, porém, a ponte de hidrogênio une dois segmentos distintos da cadeia protéica e situa-se em posição perpendicular ao eixo da cadeia polipeptídica.

Deve-se notar que a estrutura secundária tem sempre um padrão regular, já que é formada por elementos derivados de uma estrutura absolutamente regular na cadeia protéica: a ligação peptídica. As enzimas apresentam em sua conformação espacial as duas estruturas secundárias descritas. Parte da cadeia está organizada em α-hélice, parte em folha β-pregueada e aparecem ainda regiões de conformação irregular conectando os segmentos com arranjo definido (Fig. 5.9).

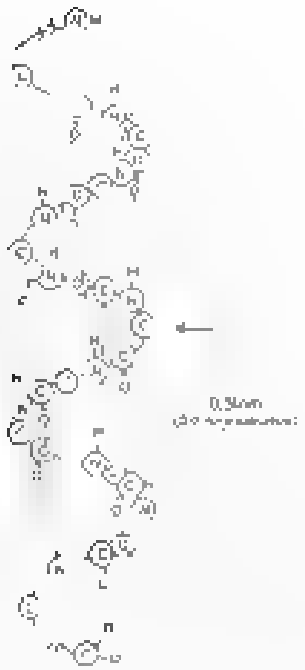


Figura 5.7 Esquema da hélice-α estabilizada por pontes de hidrogênio dispostas perpendicularmente à cadeia polipeptídica.

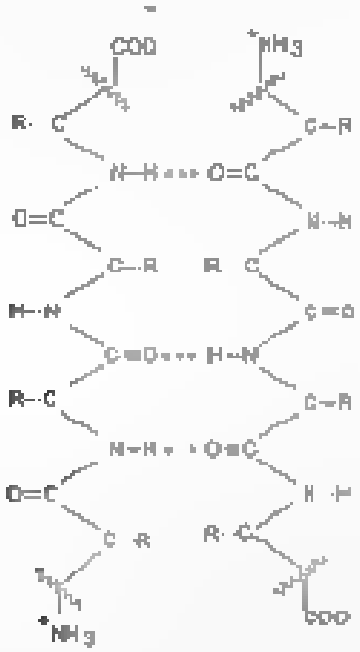


Figura 5.8 Esquema da folha β-pregueada estabilizada por pontes de hidrogênio formadas entre dois segmentos da cadeia polipeptídica dispostos perpendicularmente a ela.

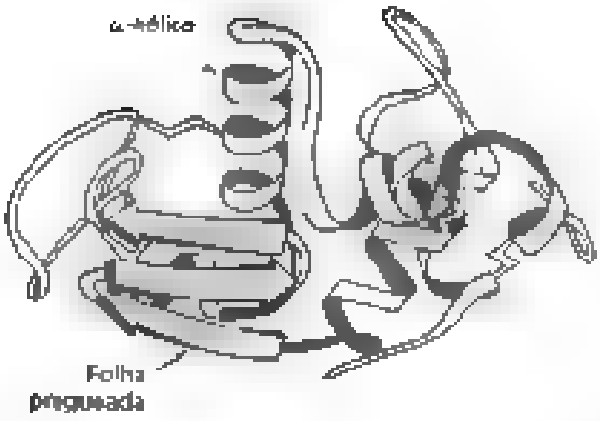


Figura 5.4 – Estrutura da lisozima, indicando segmentos em α-hélice, segmentos em folha β-pregueada (indicados por setas) e regiões sem estrutura regular.

5.2.3 – Estrutura terciária

A estrutura terciária descreve a conformação tridimensional que a molécula protéica assume em solução. É sua conformação real, pois os níveis inferiores de organização têm apenas interesse didático, não existindo proteínas que contenham apenas aquelas estruturas. A estrutura terciária explica o dobramento da cadeia peptídica com os enrolamentos, dobras e voltas que compõem e que a levam a uma forma geral globular. As ligações químicas que estabelecem e mantêm a estrutura terciária são formadas sempre entre os grupos R dos aminoácidos. Como esses aminoácidos variam em número e em posição para cada enzima considerada, a organização espacial também varia para cada enzima. As forças químicas, porém, são comuns a todas. Para entender o enovelamento da cadeia protéica, deve-se notar, em primeiro lugar, que os grupos R dos aminoácidos podem ser divididos em dois tipos (Fig. 5.4). Cerca de metade deles são apolares e, portanto, hidrofóbicos. Os outros são polares. Entre estes, alguns apresentam carga elétrica líquida positiva ou negativa, e os restantes, embora não tenham carga elétrica, são polares por apresentarem regiões do grupo R mais negativas (como o oxigênio da serina e da treonina e o enxofre da cisteína) e regiões mais positivas (como o átomo de hidrogênio ligado aqueles átomos negativos). Como a água é um solvente polar, os grupos R apolares tendem sempre a aproximar-se uns dos outros (de forma a excluir a água) e, no seu conjunto, situarem-se voltados para o interior da molécula, enquanto os grupos polares voltam-se para a superfície. Essa localização diferencial dos grupos R, provocada pelas *interações hidrofóbicas*, constitui uma força poderosa de dobramento da cadeia polipeptídica.

Outras forças devem também ser consideradas. Grupos R com carga elétrica positiva (presentes em lisina e arginina) fazem ligações eletrostáticas

com grupos laterais carregados, como aspartate e glutamate. Essas cargas são também chamadas de [illegible] e encontradas nas bioquímicas [illegible] na superfície da molécula enzimática por [illegible] [illegible] pode porém estar [illegible] [illegible] que [illegible] com carga e estão situados em [illegible] [illegible] da cadeia polipeptídica são sequestrados para a região [illegible] da molécula pela interiorização da região apolar. Outra força importante de [illegible] é dada pelas pontes de [illegible] formadas entre grupos R. Note-se que essas pontes [illegible] das pontes de hidrogênio [illegible] não apresentam qualquer padrão regular, pois a localização dos grupos R capazes de [illegible] é [illegible] para a formação [illegible] estão [illegible] regularmente [illegible] pela cadeia segundo a estrutura primária da enzima.

As interações [illegible] aqui com [illegible] responsáveis pela estrutura tridimensional das enzimas são [illegible] fracas. Mas pode ser [illegible] também uma [illegible] covalente [illegible] parte das ligações que mantêm a estrutura terciária das proteínas [illegible]. Essas ligações são formadas por oxidação de dois grupos –SH [illegible] presentes na cadeia lateral de um [illegible] de cisteína [illegible] a apresentar –SH no grupo R. Designa-se [illegible] de ponte dissulfeto [illegible] de uma molécula de enzima [illegible] cadeia polipeptídica. Nem todas as [illegible] de cisteína [illegible] porque alguns átomos [illegible] envolvidos na formação da ligação peptídica.

É importante ressaltar que a forma espacial [illegible] pela sua [illegible] e resultado indireto de sua estrutura [illegible]. Uma [illegible] que [illegible] a [illegible] de um [illegible] cada polipeptídio de uma enzima pode [illegible] completa [illegible] dos grupos R do [illegible] pode estabelecer uma ligação de estrutura terciária essencial para a [illegible] correta da enzima. De fato, a [illegible] prevê, por exemplo, a [illegible] para a estrutura terciária da subunidade de um [illegible] de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase por um resíduo de cisteína com grupo R polar. A seguir [illegible] as principais ligações da estrutura terciária.

5.2.4 Estrutura quaternária

Os termos [illegible] não são [illegible] cada [illegible] constituída pelos aminoácidos ligados por ligações [illegible] para uma [illegible] estrutura. A [illegible] estabelecida a uma [illegible] vez mais [illegible] por uma [illegible] polipeptídica organizada espacialmente pelas [illegible] quaternárias [illegible] por R.

tem uma função, são, é claro, consideradas proteínas. Outras enzimas são formadas por duas ou mais cadeias polipeptídicas iguais ou diferentes, que isoladamente não tem capacidade catalítica, nestes casos, o termo proteína só pode ser aplicado ao conjunto funcional e não às subunidades (Fig. 5.11). Estrutura quaternária é a organização presente nas proteínas compostas por mais de uma cadeia polipeptídica e descreve quantos e quais monômeros compõem a molécula e como estes monômeros estão associados. As forças que mantêm unidos os monômeros componentes de enzimas com estrutura quaternária são as mesmas que mantêm a estrutura terciária ou seja: interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações salinas, formadas, entretanto, entre grupos R de aminoácidos pertencentes a cadeias polipeptídicas diferentes. A exceção são as pontes dissulfeto, ausentes da estrutura quaternária.

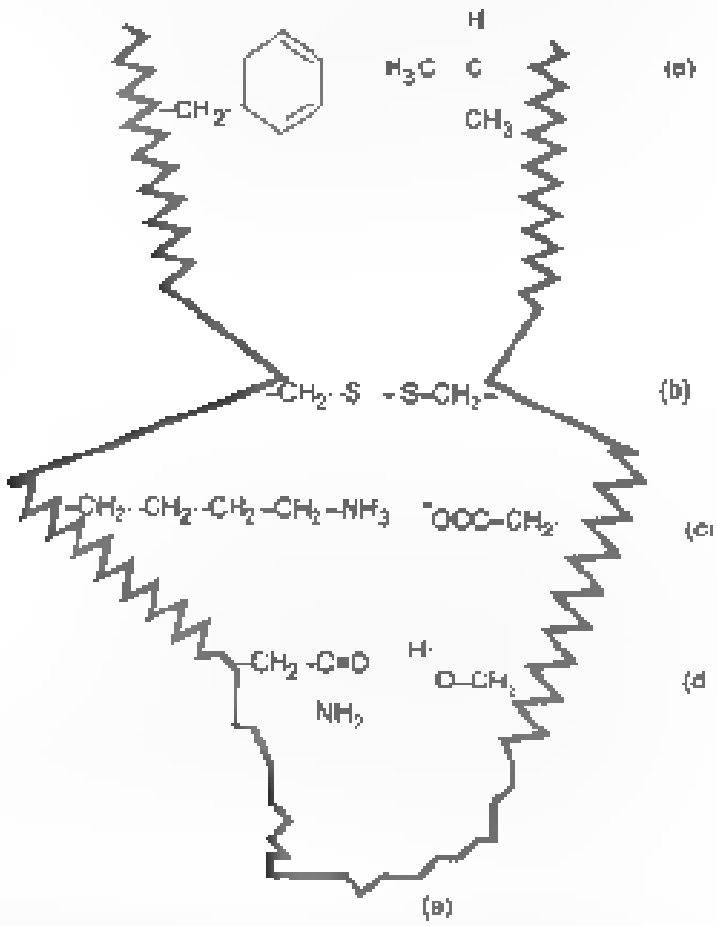


Figura 5.10 Esquema das principais ligações responsáveis pela estrutura terciária de uma enzima: (a) interação hidrofóbica; (b) ponte dissulfeto; (c) ligação eletrostática; (d) ponte de hidrogênio; (e) região sem estrutura definida.

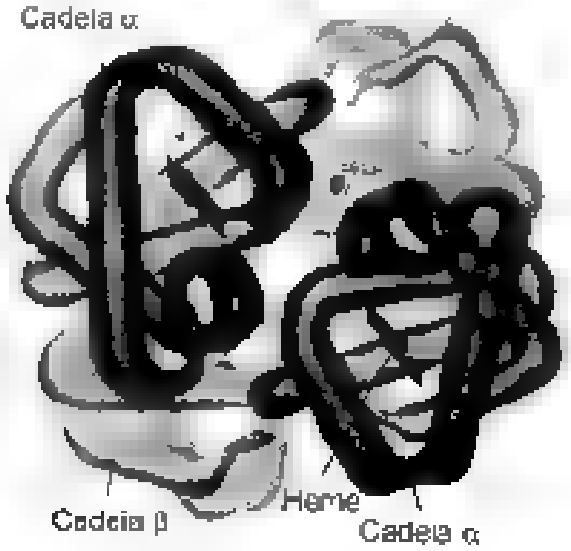


Figura 5.11 Estrutura quaternária da hemoglobina (uma proteína globular enzimática). Os grupos heme que se ligam às cadeias polipeptídicas α e β são duas a duas.

5.3 – Ação catalítica das enzimas

A partir da estrutura proteica pode-se entender melhor as propriedades catalíticas das enzimas. O primeiro ponto a considerar é a grande diferença de tamanho entre a enzima e seus substratos. Um exemplo numérico: a enzima urease, que catalisa a reação de hidrólise da uréia, tem peso molecular aproximado de 500.000 daltons, enquanto a uréia tem peso molecular de 60 e a água de 18. O investimento energético para a síntese de uma molécula proteica tão grande justifica-se pela obtenção de uma estrutura muito precisa, com reentrâncias de forma apropriada e com grupos químicos localizados em posições exatas para servir à catálise. Para que esta seja exercida, os reagentes (aqui chamados *substratos*) devem ligar-se à molécula da enzima em uma região específica de sua superfície, chamada *sítio ativo*. O sítio ativo é uma cavidade com forma definida, aberta na superfície da molécula globular da enzima, constituída por grupos R de aminoácidos que podem estar distanciados na estrutura primária da proteína, mas que os dobramentos da estrutura terciária trouxeram à proximidade uns dos outros. É essa forma definida do sítio ativo que confere *especificidade* à catálise enzimática: para ser reconhecida como substrato, uma molécula deve ter a forma adequada para acomodar-se no sítio ativo e os grupos químicos capazes de estabelecer ligações com os grupos R ali presentes (Fig.5.12).

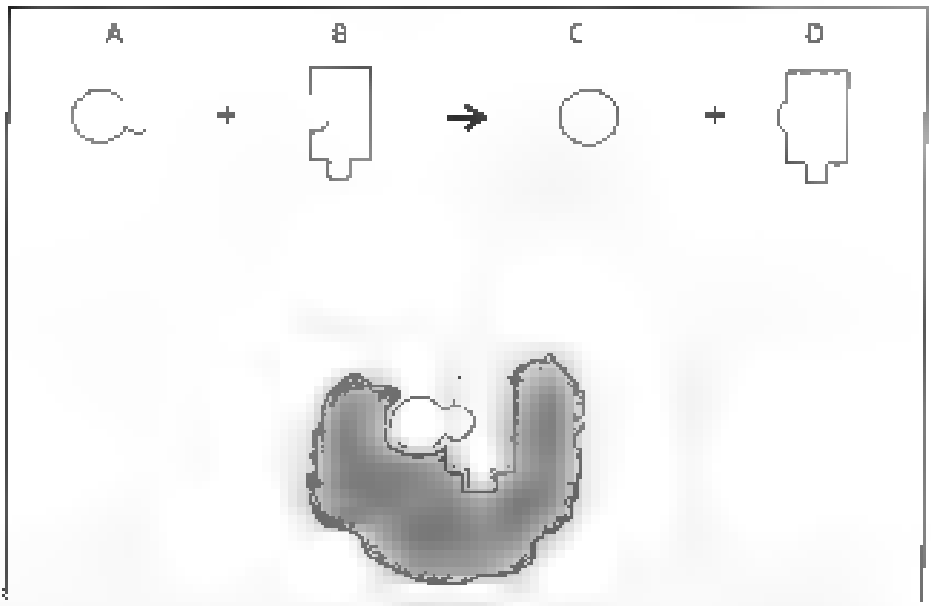


Figura 5.12 [illegible] ligação dos substratos ao sítio ativo da enzima a reação é ocorrida

A relação espacial entre substrato e enzima não deve ser vista segundo um modelo rígido de chave-fechadura. A aproximação e a ligação do substrato à enzima alteram o delicado balanço de forças responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima, amoldando sua forma à forma do substrato e fazendo-a adquirir uma nova conformação, ideal para a catálise. Assim como a enzima, os substratos têm sua conformação tensionada e distorcida, aproximando-se da conformação do estado de transição. Além disso, o substrato, corretamente posicionado no sítio ativo, está próximo de grupos R decisivos para a catálise. Retomando o exemplo mostrado na Fig. 5.3, o grupo positivo H^+ da catálise não-enzimática poderia ser substituído por um radical R positivo de um aminoácido do sítio ativo na catálise enzimática, passando, portanto, a reação a independer dos choques casuais entre as moléculas dos reagentes. É esse conjunto de mecanismos que torna a catálise enzimática tão eficiente.

5.4 – Inibição da atividade enzimática

A catálise enzimática pode ser impedida por compostos, que, quando presentes no meio, ligam-se diretamente à enzima, impedindo sua ação. Existem basicamente dois tipos de *inibidores*: competitivos e não-competitivos.

Os *inibidores competitivos* são substâncias que tem forma estrutural suficientemente semelhante à do substrato para poderem ligar-se ao sítio ativo da

enzima. Faltam-lhes, entretanto, grupos químicos que pudessem levar a reação a cabo. O resultado da sua presença no meio de reação é o estabelecimento de uma competição entre as moléculas do inibidor competitivo e as do substrato pela ligação com o sítio ativo da enzima (Fig. 5.13). Naturalmente, o percentual de inibição resultante dependerá de dois fatores: (1) as concentrações relativas de substrato e inibidor competitivo, (2) da afinidade diferencial da enzima pelo substrato e pelo inibidor. Por suas características, a inibição competitiva é bastante específica.

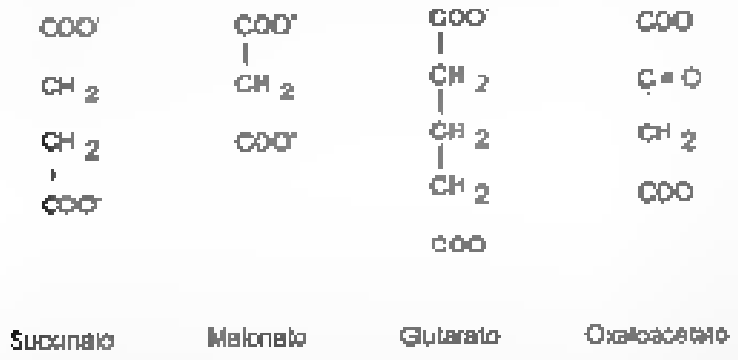


Figura 5.13 Estrutura do substrato (succinato) e de três inibidores competitivos da succinato desidrogenase.

Os inibidores *não-competitivos* têm mecanismo de ação completamente diverso. Sua forma estrutural não guarda qualquer semelhança com a do substrato e a inibição é exercida pela sua capacidade de ligar-se a grupos R específicos, geralmente fora do sítio ativo. Essa ligação, altera a estrutura da enzima, impedindo a catálise. Por exemplo, íons de metais pesados como "b" e Hg⁺⁺ ligam-se facilmente a grupos -SH. Estes são grupos frequentes em proteínas (presentes nos grupos R de cisteína). A ação inibitória dos íons é, por isso, bastante inespecífica, incidindo sobre um grande número de enzimas, o que explica a toxidez destes íons metálicos, alvo atual de sérias preocupações ambientalistas.

Os inibidores competitivos, pela sua especificidade têm tido largo emprego terapêutico e constituem um instrumento potencialmente interessante no controle de vias metabólicas. A presença de inibidores não-competitivos nos organismos é geralmente acidental.

5.5 – Regulação da atividade enzimática

Os organismos podem regular a velocidade de uma reação catalisada enzimaticamente em dois níveis diferentes. Primariamente, a síntese da enzi-

ma é um processo controlado, respondendo às variações das condições meio. Como a velocidade da reação catalisada é diretamente proporcional concentração da enzima, uma maior velocidade de síntese proteica a v metabólica da qual a enzima participa. o contrário também é verdadeir Esse nível de regulação está localizado no processo de transcrição do ge que codifica a enzima e é objeto de estudo da Biologia Molecular.

As enzimas já sintetizadas, porém, não tem uma atividade constante, e tão sujeitas a um segundo nível de regulação. A modulação de sua atividade pode dar-se através de *regulação alostérica* ou *modificação covalente*.

5.5.1 – Regulação alostérica

Alguns compostos produzidos pelo metabolismo tem a propriedade ligarem-se, com alta especificidade, a uma região de determinadas enzima designada *sítio alostérico*, diferente do sítio ativo. Como é possível prever a gação de um composto qualquer modifica a estrutura terciária da enzim com dois resultados possíveis: a nova conformação pode auxiliar a catálise, prejudicá-la. No primeiro caso, o composto é dito *efetuador alostérico positivo* no segundo, *efetuador alostérico negativo*. A enzima que apresenta o sítio alostér rico, e portanto pode receber o (ou os) efetuador alostérico (ou os efetuadores alostéricos), é chamada *enzima alostérica* (Fig. 5.14).

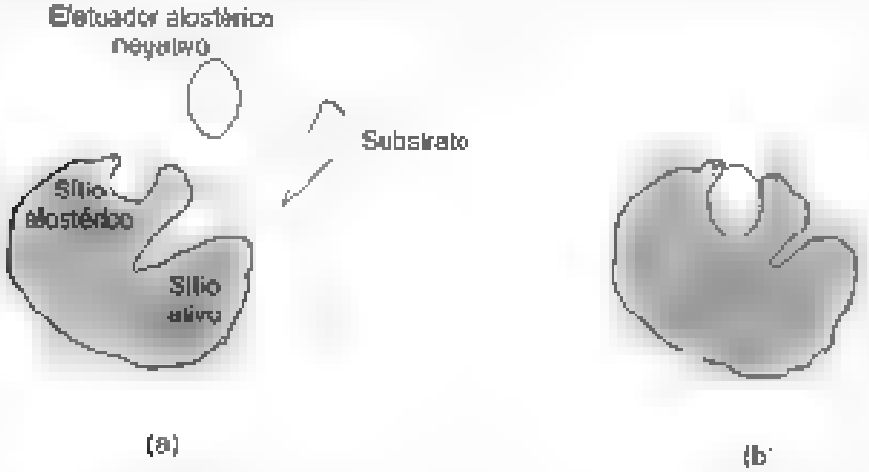


Figura 5.14 Esquema de uma enzima alostérica. A presença concentração, a ação do efetuador negativo, ou alostérico altera a estrutura da enzima, dificultando a ligação do substrato ao sítio ativo e portanto a catálise.

Esse recurso para a regulação da atividade enzimática é largamente empregado pelas células no controle de seu metabolismo. Praticamente todas as vias metabólicas contam com uma reação catalisada por uma enzima alostérica, sensível a algum dos produtos finais da via, que atua como efetuador alostérico negativo. A ligação do efetuador alostérico à enzima é revers

vel e, portanto, o percentual de enzima que se encontra ligada ao efetuador está na dependência da concentração deste. Quando o composto acumula-se em virtude do seu funcionamento da via, sua ligação à enzima alostérica acarreta diminuição da velocidade da reação por ela catalisada e a via é desacelerada. Se, a seguir, o efetuador alostérico é consumido por outra via, a diminuição de sua concentração provoca seu desligamento da enzima, que volta a funcionar com velocidade "normal". O processo constitui um mecanismo perfeito de *feedback*, impedindo o acúmulo de produtos desnecessários. O efeito alostérico é específico para um par efetuador alostérico-enzima. Assim, um determinado composto pode atuar como efetuador alostérico negativo sobre algumas enzimas e como efetuador alostérico positivo sobre outras, pertencentes a vias metabólicas diferentes. Quando a concentração celular do efetuador alostérico aumenta, algumas vias são inibidas mas, simultaneamente, outras vias são estimuladas, tornando harmônico o funcionamento celular.

5.5.2 Modificação covalente

Algumas enzimas são submetidas a um processo de regulação que consiste na ligação covalente de um grupo químico à sua estrutura. Um exemplo freqüente é a transferência de um grupo fosfato, proveniente do ATP (ou seja, Adenosina Trifosfato, o principal composto de alta energia presente nos organismos), para o enzima-alvo (Fig. 5.15). Naturalmente, a presença do grupo fosfato acarreta a mudança da conformação espacial da enzima, outra vez com duas conseqüências possíveis: para algumas enzimas a nova conformação é cataliticamente inativa; para outras, só então forma-se um sítio ativo funcional. Assim, quando várias enzimas são simultaneamente fosforiladas, o metabolismo é drasticamente alterado, sendo acionadas vias que estavam inativas e inibidas vias até então funcionando.

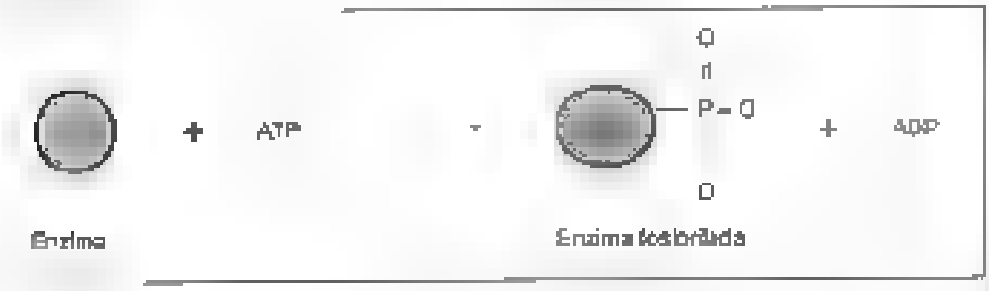


Figura 5.15 Modificação covalente de uma enzima. A ligação do grupo fosfato, proveniente do ATP, muda a conformação da enzima, alterando sua atividade.

5.6 — Influência do meio sobre a atividade enzimática

A estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isso torna a ati-

vidade enzimática dependente do meio ambiente, notadamente do pH e temperatura.

5.6.1 pH

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima — a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, que é característico para cada enzima mas, com freqüência, está próximo do pH neutro. A influência do pH sobre a catálise enzimática só pode ser compreendida a partir da análise dos grupos dissociáveis presentes nos grupos R dos aminoácidos. De fato, histidina, arginina, lisina, glutamato, aspartato, cisteína e tirosina (Fig. 5.4) têm grupos R que podem ser considerados ácidos fracos de Brönsted. Pela definição de Brönsted, ácidos são compostos capazes de dissociar-se liberando H^+. Ácidos fracos são aqueles em que a dissociação não é completa, restando em solução também uma porcentagem do ácido não dissociado, existe, portanto, um equilíbrio químico que pode ser escrito:

$$HA \leftrightarrow A + H$$

Como a equação acima sugere, as concentrações relativas de HA e de A dependem do pH. Quando o valor do pH é baixo (alta concentração de prótons), o equilíbrio rearranja-se pelo aumento da concentração de HA e diminuição da concentração de A. Quando o valor do pH é alto (baixa concentração de prótons), ocorre o inverso. Os grupos R dissociáveis dos aminoácidos comportam-se de maneira análoga, como está exemplificado na Fig. 5.16. Portanto, cada grupo apresenta-se ligado ou não ao próton, dependendo do pH.

$$-CH_2-COOH \longleftrightarrow -CH_2-COO^- + H^+ \quad (a)$$

$$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^+ \longleftrightarrow -CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2 + H^+ \quad (b)$$

Figura 5.16 Dissociação dos grupos R do aspartato (a) e da lisina (b).

A forma dos aminoácidos representada na Fig. 5.4 são as predominantes em pH = 7. Nesse valor de pH, alguns grupos R (como o grupo $-COO^-$ presente no glutamato e no aspartato) encontram-se dissociados e com carga elétrica. Outros, como o grupo $-NH_3^+$ da lisina, encontram-se associados ao próton mas também têm carga elétrica nesta situação. Uma enzima que se encontrasse em solução de pH igual a 7 apresentaria, portanto, os grupos R de seus aminoácidos na situação descrita e, portanto, aptos a formar ligações eletrostáticas importantes na estrutura terciária da molécula. Se o valor de pH da solução for diminuído, alguns grupos do tipo $-COO^-$ captam prótons, atendendo

ao aumento de sua concentração e a necessidade de manutenção do equilíbrio da dissociação ácido-base. Assim, em pH 6,0 predomina a carga neutra. A partir de estrutura da qual eventualmente participam (COO⁻) NH⁺ deixa de existir a estrutura espacial da enzima é alterada. Analogamente se o valor de pH for elevado, grupos do tipo NH⁺ se dissociam, convertendo-se a NH₂ perdendo também a carga e a estrutura da qual participam se a água mantém ceder. Além de contribuírem para a manutenção da estrutura terciária da enzima, os grupos podem fazer parte do sítio ativo e para exercerem seu papel devem apresentar carga elétrica.

Em resumo, a estrutura do pH sobre a atividade enzimática é muito complexa, envolvendo grupos ionizáveis de diversos aminoácidos. Alguns desses grupos podem fazer parte do sítio ativo e outros atuarem na manutenção da estrutura espacial da molécula. Em cada valor de pH alguns desses grupos apresentam-se protonados ou desprotonados. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados, que leva a molécula de enzima a conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Esse pH ótimo depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão alterar sua carga. A eficiência da catálise dependerá, então, de encontrarem-se enzima e substrato com conformação e carga adequadas para permitir sua interação.

5.6.2 – Temperatura

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases. Inicialmente, em pequenos aumentos de temperatura levam a aumentos de velocidade de reação, pois aumentam a energia cinética das moléculas e as colisões entre elas, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima. Em temperaturas mais altas, essa estrutura é alterada, ocorrendo a perda de sua estrutura nativa. Isso ocorre porque as ligações que mantêm a estrutura terciária, como as pontes de hidrogênio, que são ligações bastante fracas, são desarticuladas, sofrendo a cascata de alterações e rupturas, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida. A enzima é dita estar desnaturada. A temperatura que provoca a desnaturação varia muito para cada enzima, mas geralmente está próxima da sua temperatura ótima.

5.6.3 Desnaturação

A desnaturação é um processo irreversível, como a perda da estrutura que provoca a perda da atividade. Diferentemente dos agentes desnaturantes, essa

sam apenas as ligações covalentes da estrutura proteica, ou seja, as ligações peptídicas (da estrutura primária) e as pontes dissulfeto (da estrutura terciária). Não só temperaturas elevadas levam à desnaturação. Outras variáveis do meio que afetam as ligações químicas têm o mesmo efeito. Assim, valores extremos de pH provocando protonação ou desprotonação de grupos causam perda da atividade da enzima. Os *detergentes* contêm porções hidrofóbicas em suas moléculas e sua presença em solução interfere fortemente nas interações hidrofóbicas entre os grupos R importantes na manutenção da estrutura proteica. Solventes *apolares* mudando a constante dielétrica do meio alteram a força das ligações eletrostáticas, provocando desnaturação. Na maior parte dos casos, a desnaturação é um processo irreversível.

5.7 - Co-fatores e coenzimas

Muitas enzimas necessitam da associação com outras moléculas ou íons para exercer seu papel catalítico. Esses componentes da reação enzimática são genericamente chamados co-fatores. Os co-fatores podem ser íons metálicos, ou moléculas orgânicas, não protéicas de complexidade variada, que recebem o nome de *coenzimas*.

Os íons metálicos ligam-se a grupos R de aminoácidos da cadeia protéica ou estão presentes em grupos prostéticos. Cumprem papel decisivo na catálise, participando efetivamente da reação química. Algumas enzimas aceitam vários íons metálicos bivalentes, como ativadores, como Ca, Mg ou Mn, enquanto outras exigem um íon específico para a catálise. Esse íon pode ser de Fe, Cu, Ni, Co, Zn, Se ou de outros metais.

As coenzimas atuam como aceptores de átomos ou grupos funcionais retirados do substrato em uma dada reação e como doadores desses átomos ou grupos ao participarem de uma outra reação. Por isso, diz-se que as coenzimas são transportadoras de determinados grupos. Quando o S.T. Da atividade catalítica, coenzima e substrato acham-se ligados no centro ativo da enzima, consistindo a reação na remoção de determinado grupo químico do substrato e sua transferência para a coenzima, ou vice-versa. Vê-se portanto que as coenzimas não apenas sofrem modificações em sua estrutura ao participar de uma reação enzimática, mas são necessárias em quantidades estequiométricas em relação ao substrato. Todavia, o fato de as coenzimas estarem sendo constantemente recicladas, ou, ao menos entre apenas duas formas, permite que as concentrações celulares possam ser bastante reduzidas, muito menores do que as concentrações de substrato.

Quadro 5. Coenzimas e grupos que elas se ligam e desligam em diferentes reações

COENZIMA	GRUPO TRANSPORTADO
Adenosina trifosfato (ATP)	Fosfato
Biotina	CO
Coenzima A	Acila
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Hidrogênio
Tetrahidrofolato	Carbono
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Hidreto
Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeído

Nem sempre é imediata a diferença entre substrato e coenzima. No entanto, um critério diferencial é o fato de o substrato sofrer novas alterações nas reações metabólicas subsequentes, enquanto a coenzima, através de outra reação, volta à sua forma original. A reação que modifica a coenzima e a reação que restaura sua forma original são catalisadas por enzimas diferentes e específicas, que têm em comum apenas o fato de utilizarem a mesma coenzima. Além disso, na maior parte das reações, a ligação da coenzima à enzima precede a ligação do substrato à enzima.

Em alguns casos, a coenzima encontra-se covalentemente ligada à molécula enzimática, constituindo, portanto, um grupo protético da proteína; em outros casos, a coenzima é uma molécula "livre", recebendo-se à enzima apenas no momento da catálise. Duas coenzimas transportadoras de hidrogênio podem servir como exemplo das duas possibilidades: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) aparece sempre como grupo prostético de enzimas, enquanto a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) é geralmente livre, podendo atuar como coenzima de diversas enzimas (Figs. 5.17 e 5.18).

A estrutura química das coenzimas é bastante variável. Algumas coenzimas, como o ATP e o GTP (guanosina trifosfato), são diariamente sintetizadas pelas células. Outras apresentam em sua molécula um componente orgânico que não pode ser sintetizado pelos animais superiores. Esse componente, ou um precursor imediato, deve então ser obtido através da dieta, constituindo uma *vitamina*. As vitaminas são, por anto, compostos orgânicos indispensáveis ao crescimento e funções normais dos animais superiores e que, ao contrário de carboidratos, proteínas e lipídios, são requeridos na dieta em pequenas quantidades (miligramas ou microgramas diários), já que são precursores de coenzimas, cujas concentrações celulares são muito pequenas. Na Microbiologia as vitaminas incluem-se entre os compostos que, genericamente, são chamados

fatores de crescimento, assinalando a necessidade de sua presença no meio de cultura para o desenvolvimento do microrganismo. A necessidade desses compostos varia com a espécie. *Escherichia coli*, uma bactéria comum no trato intestinal humano, é capaz de multiplicar-se em uma solução contendo apenas uma fonte de carbono (glicose, por exemplo), uma fonte de nitrogênio (NH_4^+, por exemplo) e alguns sais minerais; é, portanto, capaz de sintetizar todos os compostos necessários à sua manutenção e reprodução, inclusive aqueles que, para os animais superiores, constituem vitaminas. Ou, as espécies bacterianas necessitam vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas, etc.

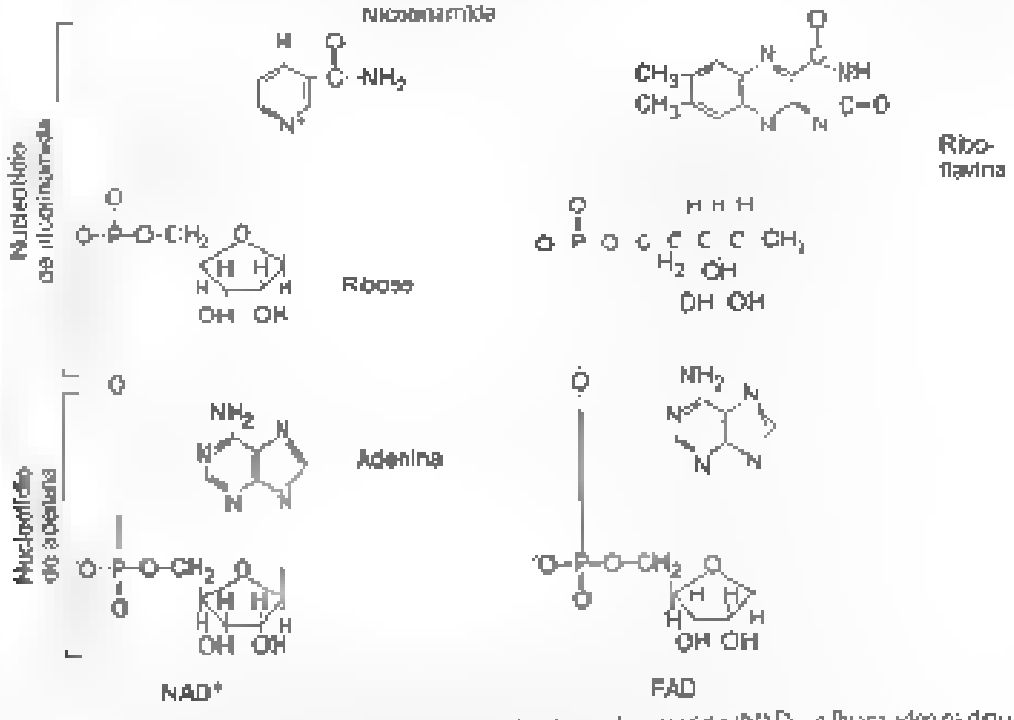


Figura 5.7 Estrutura de duas coenzimas: a nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD+) e flavina adenina dinucleotídio (FAD). Cada nucleotídio é formado por uma base nitrogenada, uma ribose e um grupo fosfato.

As vitaminas são classicamente divididas em hidrossolúveis e lipossolúveis. São hidrossolúveis: tiamina (vitamina B_1), riboflavina (B_2), ácido pantotênico (B_5), nicotinamida (B_3), piridoxina (B_6), biotina (B_7), ácido fólico (B_9), cobalamina (B_{12}) e ácido ascórbico (C). As vitaminas A, D, E e K são lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis são as que têm função de coenzimas ou fazem parte de moléculas de coenzimas. A participação das vitaminas lipossolúveis nas reações metabólicas é muito menos conhecida.

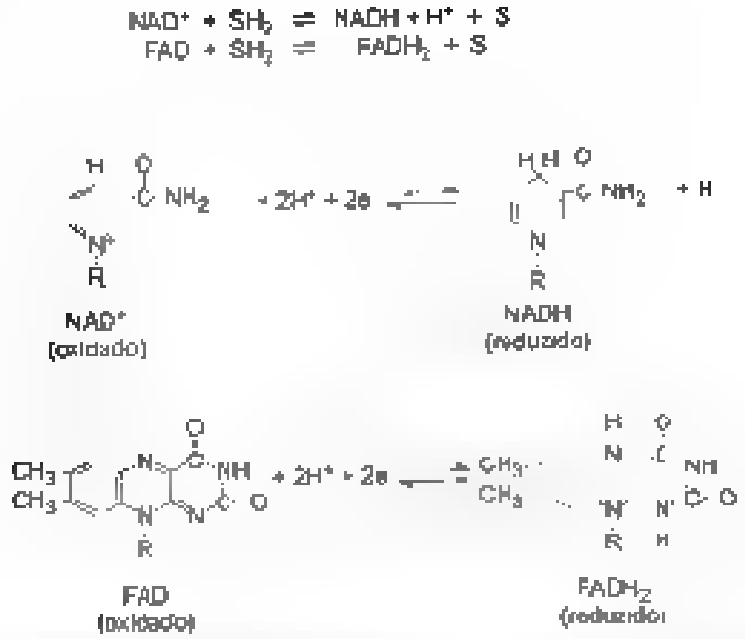


Figura 5.18 Reações de oxidorredução catalisadas por enzimas que têm NAD⁺ ou FAD como coenzima. Outro substrato (reduzido: SH₂) é oxidado pelo coenzima (NAD⁺ ou FAD) que passa a ser reduzido. O NAD⁺ recebe dois elétrons e um íon H⁺ (ou seja, o equivalente a um átomo de hidrogênio). O FAD recebe os dois átomos de hidrogênio. Não são representadas apenas as partes essenciais das moléculas. O resíduo da molécula está representado por R.

5.8 – Medida da atividade enzimática

As medidas de concentração de soluções, expressas em unidades de massa por unidades de volume, de uso corrente na Química, não têm aplicação para soluções enzimáticas, já que para estas o que importa não é a massa mas a atividade. Uma solução de enzimas desnaturadas conserva a massa protéica mas a propriedade catalítica está perdida. Desnaturações parciais podem levar duas soluções de mesma concentração enzimática a ter atividades muito diferentes.

Em virtude disso, a dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam alterar as medidas). A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional* (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura etc.), especificadas para cada caso.

A medida da atividade enzimática é imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima. Quando se pretende purificar uma enzima inicia-se o processo de isolamento a partir de um material de células orgânicas ou tecidos e/ou fluidos corporais. Tomando uma amostra desse material deve-se determinar a atividade da enzima de interesse em U.I. (internacionais) e a quantidade total de unidades presentes nesse material. Para adotar um parâmetro que permita a comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação é necessário usar um referencial, a referência bastante utilizada é a concentração total de proteína presente na preparação. Determina-se assim a atividade específica ou seja o número de unidades de enzima por miligrama de proteína. Processada a primeira etapa em direção à purificação da enzima são feitas novas medidas de atividade e de concentração de proteína e calculada a nova atividade específica. Se a etapa de purificação foi bem sucedida a atividade específica encontrada deve aumentar. Esse aumento significa não somente que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejáveis. Nos processos de purificação são efetuadas várias etapas e quando não há mais aumento da atividade específica da preparação torna-se máxima e constante indicando que a enzima está pura.

5.9 Classificação e nomenclatura

Pelas regras oficiais de classificação e nomenclatura as enzimas são divididas em seis grupos, de acordo com o tipo de reação que catalisam. Quando não, cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade. Assim por exemplo, a enzima que catalisa a remoção de vetores e elétrons entre um ácido redutase e desgrada o NAD, *oxidoredutase* e recebe o nome de classificação EC 1.1.1.1 de Enzyme Commission. Esta nomenclatura oficial é na prática muitas vezes desobedecida em favor de nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. Assim por exemplo a enzima álcool desidrogenase, a enzima que catalisa a síntese de glicogênio oficialmente designada *UDP-Glucose:α-1,4-glucan α-4-glucosyltransferase* é chamada de glicogênio sintase. Como se vê nesses exemplos na nomenclatura usual o nome é dado indicando o substrato seguido de uma outra palavra terminada em *ase* que especifica o tipo de reação que a enzima catalisa. Mesmo essa forma simplificada de nomenclatura apresenta exceções como é o caso das enzimas digestivas (pepsina, tripsina etc.) cujos nomes foram criados antes que as regras sistemáticas de classificação e nomenclatura tivessem sido feitas. Apesar disso não é necessário memorizar os nomes das enzimas pois, com um pouco de prática é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa, ou vice-versa.

Quadro 5.2 Classificação das enzimas segundo a Enzyme Commission

CLASSE	TIPO DE REAÇÃO
1 = Oxidorredutases	Oxidorredução $A + B \leftrightarrow A + B$
2 Transferases	Transferência de grupos $A\text{-}X + B \leftrightarrow A + B\text{-}X$
3 Hidrolases	Hidrólise $A\text{-}B + H_2O \leftrightarrow A\text{-}H + B\text{-}OH$
4 = Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação $\begin{matrix} X & Y \\ \mid & \mid \\ A & - B \end{matrix} \leftrightarrow A = B + X\ Y$
5 = Isomerases	Rearranjos intramoleculares $\begin{matrix} X & Y \\ \mid & \\ A & = B \end{matrix} \leftrightarrow \begin{matrix} Y & X \\ \mid & \mid \\ A & = B \end{matrix}$
6 = Ligases	Condensação de duas moléculas associada à hidrólise de uma ligação de alta energia (em geral do ATP) $A + B \leftrightarrow A\text{-}B$

Leituras complementares

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica.** 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry.** New York: Worth Publishers, 1995.

STRYER, L. **Biochemistry.** 4. ed. New York: W.H.Freeman and Company, 1995.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry.** 2. ed. New York, John Wiley & Sons, 1995.

HORTON, H.R.; MORAN, L.A.; OCHS, R.S.; RAWN, D.; SCRIMGEOUR, K.G. **Principles of Biochemistry.** Englewood Cliffs, N.J.: Neil Patterson Publishers-Prentice Hall, 1993.

ZUBAY, G.L.; PARSON, W.W.; VANCE, D.E. **Principles of Biochemistry.** Dubuque: Wm. C. Brown Communications Inc., 1995.

GARRET, R.H.; GRISHAM, C.M. **Biochemistry.** Fort Worth, Saunders College Publishing, 1995.

RETTER, P. **Biochemistry-A Foundation.** Pacific Grove, California: Brooks/Cole Publishing Company, 1996.

6 CAMINHOS METABÓLICOS

Otto Jesus Crocomo e Luiz Eduardo Gutierrez

6.1 – Introdução

Todas as reações químicas que acontecem no contexto da célula e, portanto, são reações bioquímicas, são importantes para o aparecimento e continuação da vida sobre a Terra, mas há algumas que historicamente apresentam maior importância. É o caso das reações da fermentação de carboidratos, mais especificamente de hexoses, que Gay Lussac em 1815 representou pela seguinte equação geral:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 \quad \Delta F = 56{,}000 cal/mol \qquad (6.1)$$

Na realidade, a reação bioquímica representada por essa equação engloba uma série de reações intermediárias elucidadas graças à descoberta pelos irmãos Buchner nos finais do século passado em células de levedura, de enzimas que seriam responsáveis pelo processo fermentativo, e aos exaustivos trabalhos de Parnas, Embden, os Cori, Lohmann, Meyerhoff, Warburg e muitos outros pesquisadores, na primeira metade deste século. A degradação de glicose nos músculos dos animais e a fermentação alcoólica em leveduras são semelhantes, o que facilitou a visualização das reações. A bioquímica comparada auxiliou grandemente o avanço dos conhecimentos nessa área. Esses resultados foram corroborados com o uso de técnicas isotópicas em levedura por KUBAN AND WEISSHEIMER, fazendo com que se estabelecesse definitivamente a sequência de reações bioquímicas que recebe o nome de glicólise, ou seja, a molécula de hexose (representada pela glicose) é cindida (lisada) em um determinado momento na série de reações, inicialmente há formação de açúcar fosforilado, seguindo-se seu desdobramento até triosefosfato, o que sofre oxidação produzindo finalmente piruvato, produto final da glicólise.

6.2 Processos de obtenção de energia

6.2.1 Glicólise ou via de Embden-Parnas-Meyerhof

Caminho metabólico da glicose em várias fases

1ª fase — Fosforilação do açúcar

No início do século XX, os trabalhos de Harden e Young, por o fato de que extratos de levedo fermentavam [illegible] mesmo quando [illegible] capazes de se dividir e operar. Observou-se posteriormente que o processo era [illegible] por uma fração [illegible] que [illegible] Nos [illegible] que extratos de músculos [illegible] degradados em glicogênio e ácido lático. [illegible] pela ação de uma [illegible] que existe em [illegible] Observou-se que embora essa enzima seja [illegible] em levedura [illegible] as [illegible] necessárias para a sua [illegible].

A glicose [illegible] de Robison [illegible] a [illegible] para a [illegible] para a [illegible] para [illegible] grupo [illegible] Argen [illegible] pesquisadores observaram [illegible] entre os grupos [illegible] enzima [illegible] fosfato [illegible] reação.

A enzima [illegible] duas formas: uma fosforilada, fosfoenzima, e uma não fosforilada, defosfoenzima.

A. A fosfoenzima transfere o grupo fosfato para a molécula de glicose, resultando [illegible] fosfato.

$$\text{glicose-6-fosfato} + \text{fosfoenzima} \leftrightarrow \text{glicose-1,6-difosfato} + \text{defosfoenzima} \quad (6.2)$$

B. A defosfoenzima reage com o difosfato.

$$\text{glicose-1,6-difosfato} + \text{defosfoenzima} \leftrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \text{fosfoenzima} \quad (6.3)$$

Segue-se, então a isomerização de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato (éster de Neuberg), catalisada pela enzima fosfohexoseisomerase (Fig. 6.1)

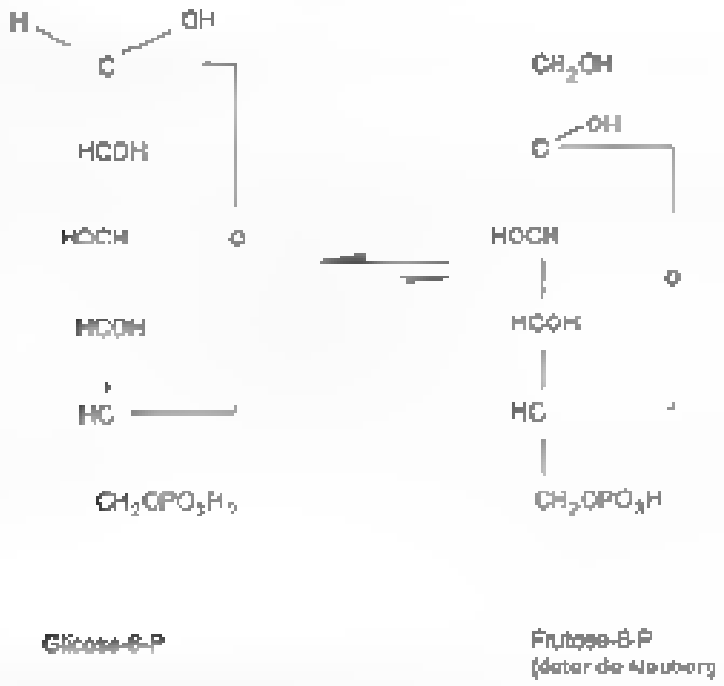


Figura 6.1 Isomerização entre glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato

A formação dessas duas fosfohexoses pode dar-se também pela transferência de fosfato da molécula de adenosina trifosfato (ATP) para a molécula de glicose ou de frutose, pela ação de hexoquinase, em presença de íons magnésio

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \text{ADP} \qquad (6.4)$$

$$\text{Frutose} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{frutose-6-fosfato} + \text{ADP} \qquad (6.5)$$

O equilíbrio da reação desloca-se no sentido da formação dos ésteres fosforilados, entretanto experimentos com glicose-6-fosfato-^{14}C e glicose-^{14}C indicam que ela é reversível.

Hexoquinase exige Mg^{++} porque um dos componentes (ATP) da reação não está sob a forma de ATP^{4-}, e sim na de complexo $MgATP^{2-}$ (Fig. 6.2)

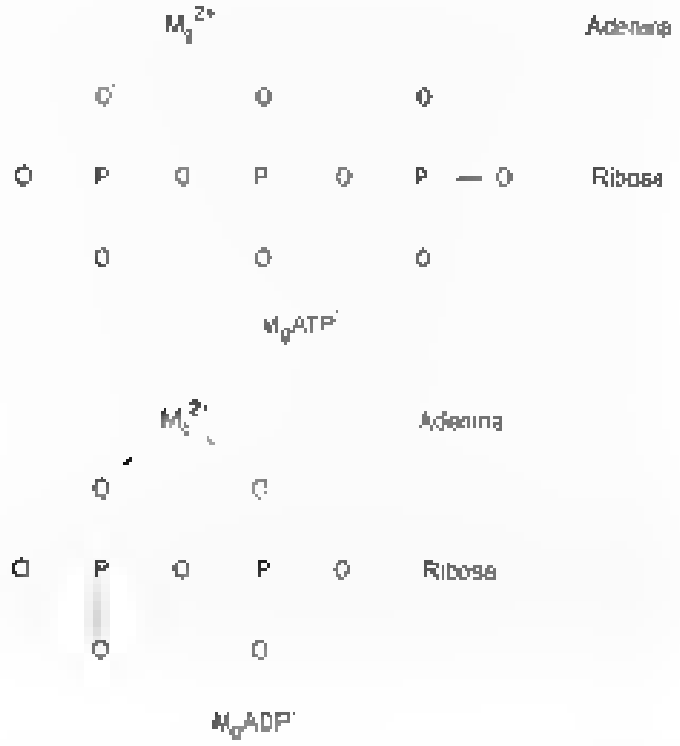


Figura 4.3 Complexo MgATP

Por outro lado, glicose-6-fosfato sofre isomerização produzindo frutose-6-fosfato pela ação da enzima fosfoglicoisomerase. Essa reação envolve a migração do oxigênio carbonílico do C-1 para o C-2, exige também íons magnésio e é prontamente reversível.

$$\text{Glicose-6-fosfato} \leftrightarrow \text{frutose-6-fosfato} \qquad (6.6)$$

Uma vez formada, frutose-6-fosfato converte-se em frutose-1,6-difosfato, éster de Harden-Young, em presença de ATP e íons magnésio, em uma reação catalisada pela enzima fosfofruto-quinase.

$$\text{Frutose-6-fosfato} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{frutose-1,6-difosfato} + \text{ADP} \qquad (6.7)$$

2ª fase **Desdobramento do açúcar fosforilado**

Graças à ação de frutose-difosfato-aldolase, ou simplesmente aldolase, a frutose-1,6-difosfato é cindida em duas moléculas de triosefosfato: fosfodiidroxiacetona (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GA-3P). Tão logo são formadas, essas duas triosefosfatos entram em equilíbrio entre si, em presença de fosfotrioseisomerase.

$$\text{Frutose-1,6-difosfato} \leftrightarrow \text{dihidroxiacetona fosfato} + \text{gliceraldeído-3-fosfato} \qquad (6.8)$$

Essa reação é a cisão da molécula original de hexose que foi fosforilada nos C 1 e 6, e então clivada para formar as 2 moléculas de triosefosfato, as quais na realidade são moléculas de gliceraldeído 3 fosfato, uma vez que as reações posteriores dependem de GA-3P e, portanto, esta molécula é que será desassimilada, dando formação a ácido 3-fosfoglicérico.

3.ª fase – Oxidação de triose-fosfato

Needham estudou a oxidação do 3-fosfoglicéraldeído em músculos e Meyerhoff, e também Green, em músculos e células de levedura. Trabalhos posteriores de Negelein e de Warburg demonstraram que a oxidação processa-se em duas etapas: inicialmente a molécula de GA-3P dá formação a 3-fosfoglicerofosfato, também denominado ácido 1,3-difosfoglicérico (1,3-DPGA), em uma reação catalisada pela enzima desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato e que exige fosfato inorgânico e dinucleótido de nicotinamida-adenina oxidado (NAD). A oxidação da forma aldeídica é precedida pela sua fosforilação, com formação de um éster tiólico como intermediário. Glutationa tiólica é o grupo prosthético da desidrogenase de GA-3P, que é uma enzima-SH. Desse modo, a oxidação de triosefosfato pode ser visualizada na Fig. 6.3.

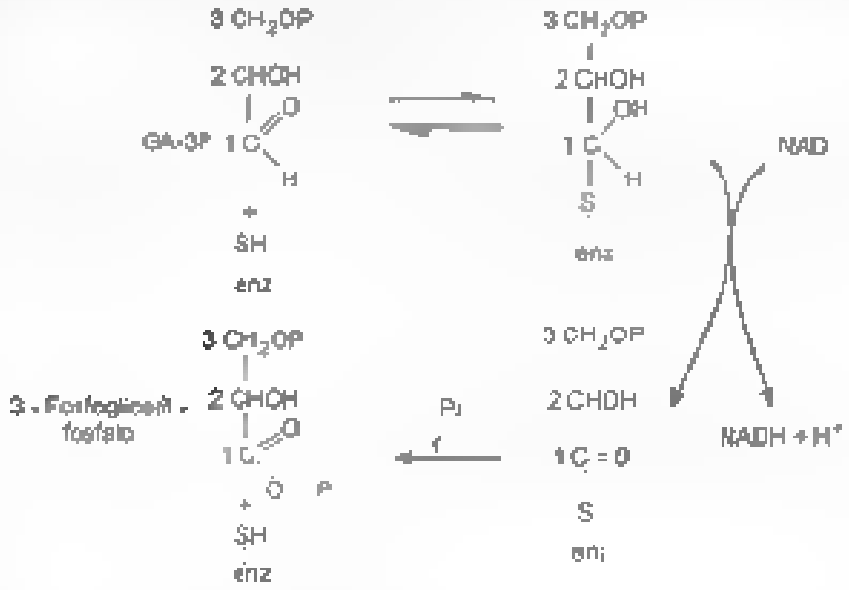


Figura 6.3 Oxidação de triosefosfato

Essa é uma das reações glicolíticas onde ocorre conservação de energia, a qual, posteriormente, aparecerá sob a forma de ATP. Observe-se que durante a reação o grupo aldeído do GA-3P sofre desidrogenação, produzindo um anidrido carboxílico com o ácido fosfórico (Pi, fosfato inorgânico). Esse anidrido é o 3-fosfoglicerofosfato, que é um acil fosfato com alta energia de hidrólise (ΔG' = –11,8 kcal/mol) localizada no C 1 de sua molécula. A 3-

gação fosfórica do C-3 e de baixa energia livre de hidrólise padrão, cerca de 3,2 kcal/mol.

A enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase tem peso molecular igual a 140 000 e contém 4 subunidades idênticas, cada uma consistindo de uma cadeia polipeptídica simples, com aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos. A enzima é inibida por iodoacetato, que se combina com os grupos SH essenciais da enzima, inibindo-a. A descoberta dessa inibição é um dos mais importantes marcos da bioquímica de elucidação dos passos metabólicos comprometidos na glicólise e no processo fermentativo.

Na segunda etapa, a enzima fosfoglicerocinase, na presença de íons magnésio, catalisa a transferência do grupo de fosfato rico de energia para ADP, recuperando a energia sob a forma de ATP. Ao mesmo tempo, forma-se o ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA):

$$\text{3-fosfoglicerofosfato} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{ácido 3-fosfoglicérico} + \text{ATP} \qquad (6.9)$$
$$(\Delta G' = -4,50 \text{ kcal/mol})$$

Essa reação mais a que a precede constituem um processo de acoplamento bioquímico de energia.

Nos estudos iniciais da glicólise, Embden observou que extratos de músculo eram capazes de metabolisar 3-PGA, com formação de piruvato e fósforo inorgânico. Essas observações foram seguidas pelas de Lohmann e de Meyerhoff, que isolaram o ácido 2-fosfoenolpirúvico como intermediário nessa reação.

A formação desse ácido fosfórico ocorre pela eliminação de água e desvio do grupo fosfórico de posição C-3 para a posição C-2 na molécula de 3-PGA. Postulou-se, então, e comprovou-se que em extratos de levedura o 2-PGA era intermediário na reação. A conversão de 3-PGA em 2-PGA se dá graças à ação da enzima fosfoglicomutase, que requer o ácido 2,3-difosfoglicérico (2,3-DPGA) como coenzima (Fig. 6.4).

Figura 6.4 Esquema da conversão de 3-PGA em 2-PGA

4.ª fase **Formação de piruvato**

A formação do produto final da glicólise, piruvato, é precedida pela remoção de uma molécula de água de 2-PGA, catalisada por enolase, produzindo

do fosfoenolpiruvato (PEP) em presença de íons magnésio, em uma reação com geração de composto fosfatado rico de energia

$$\text{2-fosfoglicerato} \leftrightarrow \text{fosfoenolpiruvato} + H_2O \quad (\Delta G' = +0,44 \text{ kcal/mol}) \tag{6.10}$$

A energia livre de hidrólise padrão de PEP é de cerca de −14,8 kcal, enquanto que a de 2-PGA é de cerca de −4,2 kcal. A perda da molécula de água de 2-PGA determina uma redistribuição de energia dentro da molécula, criando uma molécula com alta energia livre que é liberada quando o grupo fosfato de PEP é posteriormente hidrolisado.

A enzima enolase possui peso molecular igual a 85 000 e exige íons magnésio que formam um complexo com a enzima antes da união com o substrato. A enzima é inibida por íons fluoreto e fosfato; na realidade o íon fluorofosfato une-se ao magnésio, formando o verdadeiro agente inibidor. Entretanto, íons manganês podem substituir os íons magnésio como co-fatores da enzima, e nesse caso não ocorre a inibição.

Finalmente, pela ação de quinase piruvica, fosfoenolpiruvato transfere seu grupo fosfato rico de energia para o ADP, com formação de enolpiruvato e ATP, em presença de íons magnésio e potássio.

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + ADP \leftrightarrow \text{enolpiruvato} + ATP \tag{6.11}$$

A forma enólica de piruvato sofre um rearranjamento rápido e não enzimático para produzir a forma cetônica (cetopiruvato), que predomina em pH 7,0 (Fig. 6.5).

Figura 6.5 Rearranjamento não enzimático entre as formas enólica e cetônica de piruvato.

O equilíbrio dessa reação desloca-se para a direita e, por ação de massa, a reação de quinase piruvica é direcionada para a formação de cetopiruvato, dando uma reação global assim representada:

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + ADP^{2-} + H^+ \rightarrow \text{cetopiruvato} + ATP^{3-} \quad \Delta G^{\circ\prime} = -7,5 \text{ kcal/mol} \tag{6.12}$$

A reação processa-se em presença de íons potássio e magnésio ou manganês. O elevado valor da energia livre padrão dessa reação é devido, em parte, ao fato da conversão espontânea da forma enólica do piruvato para a forma cetônica. Cerca de metade da energia livre padrão de hidrólise do fosfoenolpiruvato (14,8 kcal/mol) é recuperada como ATP (7,5 kcal/mol), sendo o restante (7,5 kcal/mol) utilizado para direcionar a reação para a direita, uma vez que em condições fisiológicas esta reação é essencialmente irreversível.

A sequência geral das reações bioquímicas envolvidas no processo glicolítico, é apresentada a seguir, esta visualizada na Fig. 6.6.

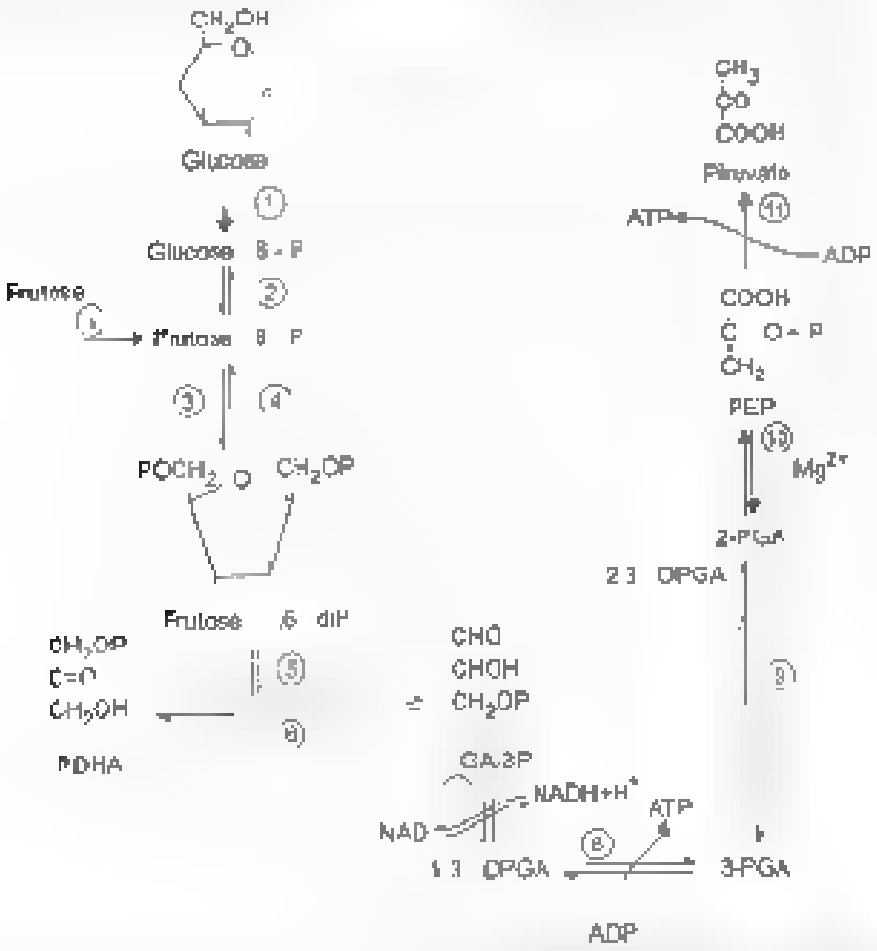


Figura 6.6 Esquema geral: Enzimas: 1) hexoquinase; 2) fosfohexoisomerase; 3) fosfofrutoquinase; 4) frutose 1,6-difosfatase; 5) triose fosfato isomerase; 6) desidrogenase de gliceraldeído 3-fosfato; 7) fosfoglicerquinase; 8) fosfoglicerol mutase; 10) enolase; 11) quinase pirúvica.

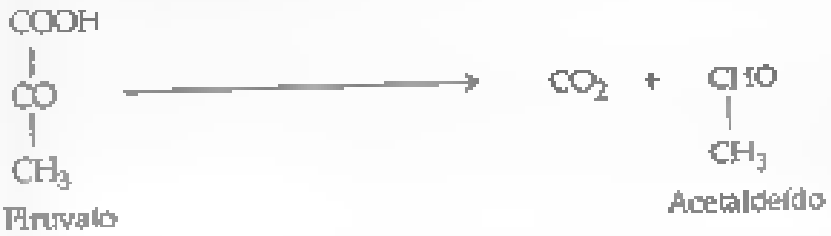
6.2.2 – Fermentação alcoólica

É um processo anaeróbio para produção de energia, que ocorre com degradação de carboidratos e formação de etanol e CO_2 como compostos prin-

pas e como subprodutos glicerol, ácidos pirúvico e succínico e álcoois superiores. É realizada por leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces* e bactérias como a *Zymomonas mobilis*.

A sequência das reações é a mesma apresentada na Fig. 6.6 do processo glicolítico até a formação do piruvato. A partir de piruvato as seguintes reações ocorrem:

Ação da descarboxilase pirúvica



(6.13)

A descarboxilase pirúvica exige pirofosfato de tiamina (TPP) como co-fator e a atividade é prejudicada pela presença de sulfito, pois este bloqueia o TPP. A enzima não é altamente específica atuando sobre outros cetoácidos.

Ação da desidrogenase alcoólica

(6.14)

A enzima é inibida por sulfito, porque o acetaldeído forma um composto de adição com o íon HSO_3^-.

EFEITO PASTEUR: em meio anaeróbio ocorre decréscimo na produção de etanol e redução do consumo de açúcar. A explicação mais aceita é dada pela atividade da fosfofrutoquinase, enzima alostérica da glicólise, que é inibida por ATP e citrato, presentes em maior quantidade no meio aeróbio e ativada por AMP, ADP e fosfato inorgânico.

EFEITO CRABTREE: para algumas leveduras, altas concentrações de açúcares inibem a atividade de enzimas respiratórias e a formação de mitocondrias, ocorrendo portanto a produção de etanol, mesmo em meio aeróbio.

FORMAÇÃO DE GLICEROL: durante a fermentação alcoólica cerca de 5% do açúcar consumido pode ser convertido em glicerol a partir de um desvio da fosfodidroxiacetona da glicólise:

$$\begin{array}{lcccccc} CH_2OH & & & CH_2OH & & CH_2OH & \\ C{=}O & + & NADH + H^+ & \rightarrow & CHOH & \rightarrow & CHOH \quad + \; Pi \\ CH_2OP & & & & CH_2OP & & CH_2OH \\ \text{Fosfodidroxiacetona} & & & & \text{Glicerofosfato} & & \text{Glicerol} \end{array} \qquad (6.15)$$

A formação de glicerol durante a fermentação alcoólica foi explicada por NORDSTROM[1] como consequência da produção de biomassa pelas leveduras pois é um processo oxidativo que exige NAD oxidado e também por OURA[3] segundo o qual a formação do ácido succínico seria a principal causa da formação do glicerol.

FORMAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES: durante o processo de biossíntese de alguns aminoácidos como valina, treonina, leucina e isoleucina são produzidos cetoácidos intermediários como descrito por WEBB INGRAHAM[4]. Ocorre descarboxilação e redução desses ácidos pela descarboxilase pirúvica e desidrogenase alcoólica com produção dos álcoois como esquematizado:

Leucina	→ alfacetoisocapróico	→ isoamílico
Valina	→ alfacetoisovalérico	→ isobutílico
Isoleucina	→ alfaceto betametilvalérico	⟶ amílico ativo
Treonina	→ alfacetobutírico	→ n-propílico

FORMAÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO: o ácido succínico é formado durante a fermentação alcoólica através da fase oxidativa do ciclo de Krebs:

Piruvato → Acetil-CoA

Oxaloacetato + Acetil-CoA → Citrato
↓
Isocitrato
↓ → NADH
Alfacetoglutarato
↓ → NADH
Succinil-CoA
↓
Succinato

Como em meio anaeróbio não há formação de NADH necessários ativação da desidrogenase succínica não apresenta atividade e portanto acumula-se succinato.

6.2.3 – Fermentação lática

As bactérias lácticas homofermentativas como *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis* e *L. delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* e *Pediococcus urinosus* fermentam glicose, frutose, galactose, manose, sacarose com produção de ácido lático através da seqüência glicolítica. Como o meio é anaeróbio, há necessidade de regeneração de NAD pela desidrogenase lática.

glicose $\xrightarrow{\text{glicólise}}$ pirúvico + NADH + H^+ ⟶ LACTATO

No caso de galactose, as bactérias lácticas fosforilam até galactose-6P, em seguida é isomerizada até tagatose-6P, isomerizada até tagatose-1,6-difosfato e cindida nas trioses fosfodihidroxiacetona e gliceraldeído 3P.

No processo heterofermentativo, pode ocorrer, dependendo da espécie envolvida, produção de lactato, etanol, gás carbônico e acetato. A formação de etanol pode ser esquematizada pelas reações:

glicose → glicose-6P → 6P gluconato → ribulose-5P

ribulose-5P → xilulose 5P → acetil-PO_4 + Gl-3P

↓

acetil-CoA

↓

acetaldeído

↓

ETANOL

Alguns subprodutos da fermentação lática, como acetaldeído, acetona, acetoína e diacetil, são importantes para o aroma em alimentos produzidos com essas bactérias. Acetaldeído originado de piruvato e dos aminoácidos aspartico, metionina e treonina; diacetil e acetoína são produzidos a partir de citrato.

6.2.4 Fermentação acetona-butanol

A fermentação de açúcares com produção de ácido butírico foi descoberta por PASTEUR em 1861 (GOTTSCHALK, 1). De modo geral, apenas anaeróbios obrigatórios como *Clostridium* são capazes de formar ácido butírico como produto principal da fermentação.

Algumas espécies de *Clostridium*, como *Clostridium acetobutylicum*, são capazes de produzir pequenas quantidades de butanol e acetona, como pode ser visto nas passagens:

Glicose $\xrightarrow{\text{glicólise}}$ piruvato ⟶ acetil-CoA → acetoacetil-CoA

Acetil-acetil-CoA → acetoacetato → ACETONA

↓

Butril-CoA ⟶ butiraldeído → BUTANOL

6.2.5 - Formação de metano

Outro processo anaeróbio interessante é a formação de metano pelas bactérias metanogênicas como as *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* e *Methanomonas*, que conseguem obter energia a partir dos substratos hidrogênio mais ácido carbônico, ácido fórmico, metanol, metilamina e ácido acético, dependendo da espécie.

A formação de CH_4 a partir de metanol e H_2 está acoplada, em *Methanosarcina barkeri*, com a formação de ATP pela ATP sintase.

Exemplos de capacidade energética de algumas reações:

$$CH_3\text{-}OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O \qquad \Delta_F = 26{,}9\ kcal \qquad (6.16)$$

$$CO_2 + 4H \rightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad \Delta_F = 32{,}4\ kcal \qquad (6.17)$$

$$4\ H\text{-}COOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O \qquad \Delta F = 34{,}5\ kcal \qquad (6.18)$$

6.2.6 - Mecanismo de Entner-Doudoroff

O processo glicolítico ou de EMBDEN-PARNAS-MEYERHOF descrito anteriormente é encontrado em considerável número de organismos: microorganismos, vegetais e animais. Porém, há microorganismos como *Pseudomonas saccharophila*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhizobium japonicum*, *Xanthomonas phaseoli*, *Thiobacillus ferrooxidans* que apresentam outro mecanismo para a degradação de açúcares, mecanismo conhecido como de ENTNER-DOUDOROFF (ED). No caso da *Escherichia coli* pode ocorrer a presença das duas vias em função do substrato: na presença de glicose ocorre glicólise e na presença de gluconato é via de Entner-Doudoroff. Esse mecanismo é encontrado em grande número de bactérias gram-negativas.

Como pode ser observado na Fig. 6.7, a glicose-6P é desidrogenada até 6P-gluconato, reação que envolve a presença de NADP e água. E na seguinte 6P-gluconato é convertido em uma molécula de gliceraldeído-3P e uma de piruvato, através da ação das enzimas desidratase e aldolase. Gliceraldeído-3P é oxidado até piruvato pelas enzimas do processo glicolítico. Um ponto interessante para destacar é a produção de ATP enquanto na sequência glicolítica o rendimento líquido é de 2 ATP/mol de glicose, na Entner-Doudoroff é de apenas 1 ATP/mol de glicose.

Existem muitas enzimas comuns aos dois processos, sendo que as enzimas chaves do processo Entner-Doudoroff são:

6P-gluconato desidratase
2-ceto-3-deoxi-6P-gluconato aldolase

Dois métodos podem ser utilizados para detectar qual processo a célula está utilizando para a degradação de açúcares.

Método 1: coletar as células crescidas em glicose, extrair as enzimas e detectar as atividades. Se níveis elevados de 6P-gluconato desidratase e 2-ceto-3-deoxi-6P-gluconato aldolase e baixos níveis de fosfofruto-quinase forem encontrados, trata-se de um organismo realizando o processo ED.

Método 2: comparando-se o processo glicolítico (Fig. 6.6) com o processo ED (Fig. 6.7), nota-se que o carbono carboxílico do ácido pirúvico na glicólise origina-se dos carbonos 3 e 4 da glicose, enquanto no processo ED origina-se dos carbonos 1 e 3 da glicose. Assim, o método de radiorrespirometria, utilizando glicose com os carbonos 1, 3 e 4 radioativos, pode ser utilizado para essa diferenciação.

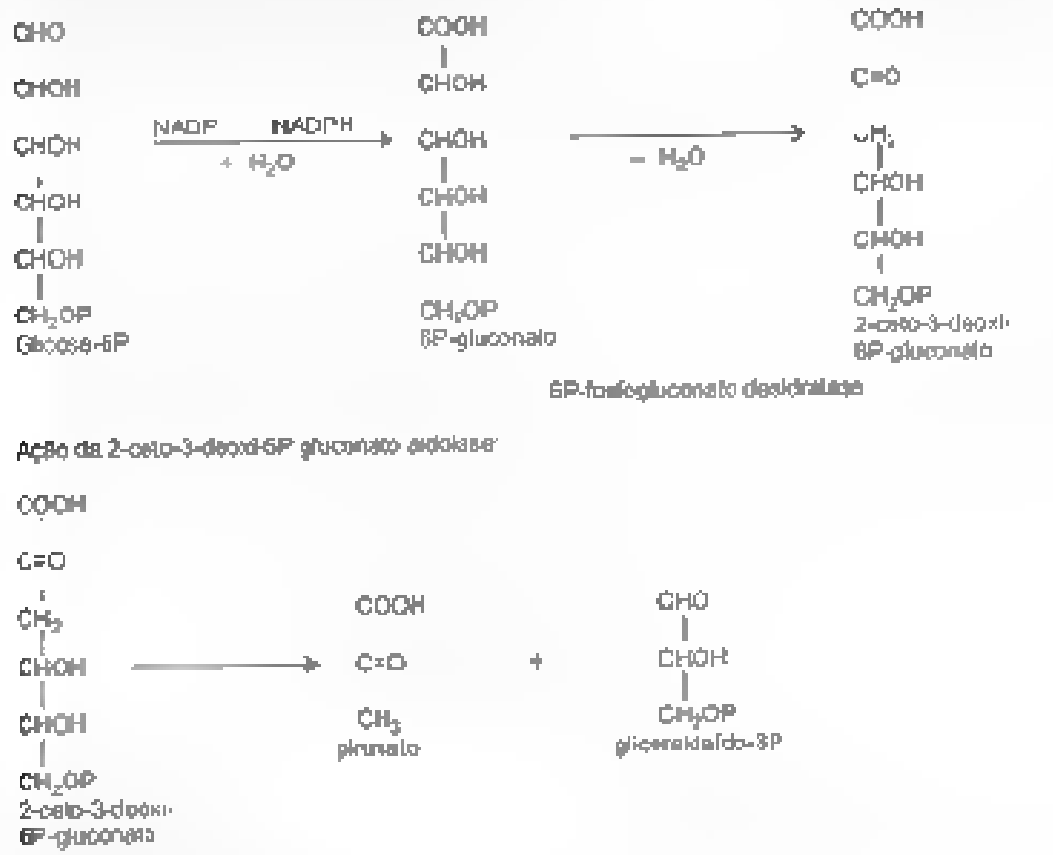


Figura 6.7 – Processo Entner-Doudoroff

6.2.7 Processo do ciclo das pentoses

A maioria das células de microrganismos, vegetais e animais utilizam o ciclo das pentoses (Fig. 6.8) para a produção de pentoses necessárias para a

formação dos nucleotídeos dos ácidos nucléicos, ATP, coenzimas, etc., além da formação de NADPH + H⁺ para os processos biossintéticos.

Alguns microrganismos como *Thiobacillus novellus* e *Brevibacterium abortus* são deficientes em enzimas-chaves dos processos glicolíticos e ED, entretanto crescem em meio de glicose. Essas bactérias utilizam-se do ciclo das pentoses, desviando gliceraldeído-3P para oxidação até pirúvato e posteriormente do ciclo de Krebs para a produção de energia acoplado ao transporte de elétrons. Também há a possibilidade de ocorrer a ação de vias o ciclo ocorre na *Gluconobacter*, bactéria acética que apresenta o ciclo de Krebs operando parcialmente.

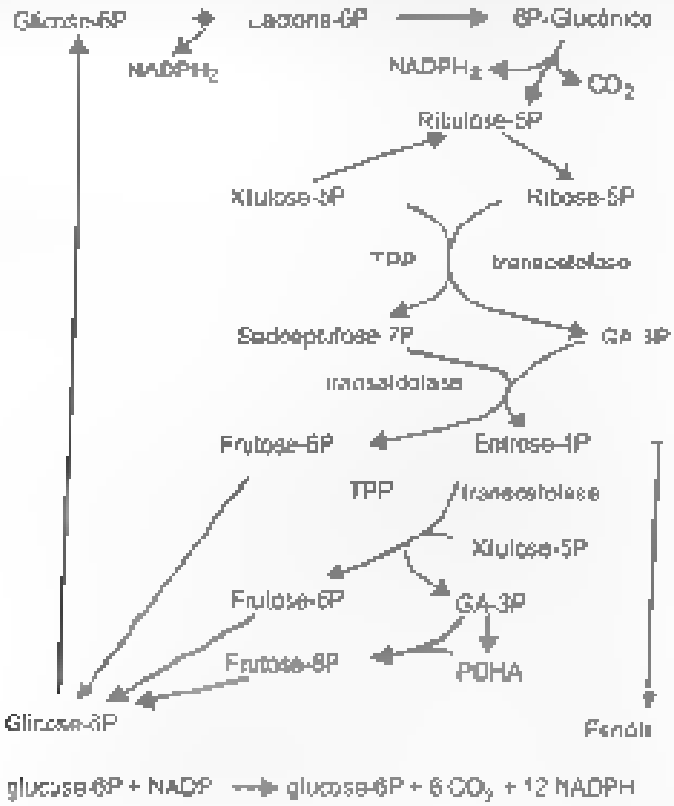


Figura 6.8 *Ciclo das pentoses*

6.2.8 Processo aerobio

Os organismos que se utilizam do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico ou dos ácidos tricarboxílicos) para a produção de coenzimas reduzidas para a cadeia respiratória e de compostos precursores para as biossínteses são mais eficientes no processo de obter energia a partir da glicose, podendo ainda recuperar essa energia a partir da degradação de ácidos graxos e aminoácidos.

Para a operação do ciclo de Krebs a partir do piruvato há necessidade de reação inicial de ativação com a formação de acetil-coenzima A (complexo

enz mático da piruvato oxidase que exige os co-fatores NAD coenzima A pirofosfato de tiamina, ácido lipóico e magnésio, converte piruvato em acetil-CoA conforme a reação:

$$\text{Piruvato} + \text{NAD} + \text{HS-CoA} \xrightarrow[\text{TPP}\quad \text{Mg}^{+2}]{\text{Ácido lipóico}} \text{Acetil-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^{+} \qquad (6.19)$$

Acetil-CoA pode também ser formado a partir da betaoxidação dos ácidos graxos e da oxidação de aminoácidos.

Componentes do ciclo de Krebs como alfacetoglutarato e oxaloacetato são precursores para a síntese de glutamato e aspartato, respectivamente. Succinil-CoA é precursor para a síntese das porfirinas.

As reações do ciclo de Krebs estão sumarizadas na Fig. 6.9.

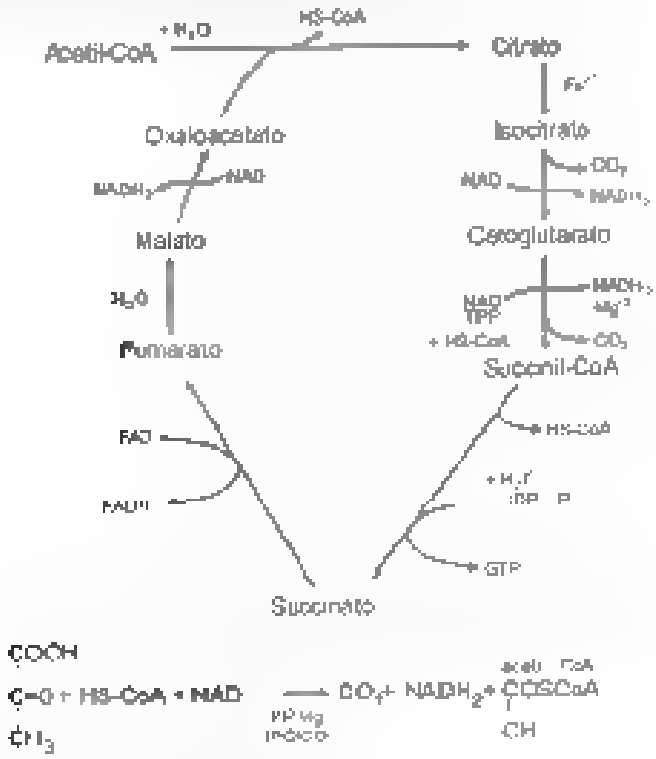


Figura 6.9 Ciclo de Krebs

As coenzimas FADH e NADH + H são reoxidadas no processo do transporte de elétrons acoplado à fosforilação oxidativa, conforme esquema apresentado na Fig. 6.10. Deve-se chamar atenção para a necessidade de algumas vitaminas do complexo B para a formação das coenzimas atuantes no processo aeróbico de obtenção de energia: niacina (NAD), tiamina (TPP), riboflavina (FAD), ácido pantotênico (coenzima A).

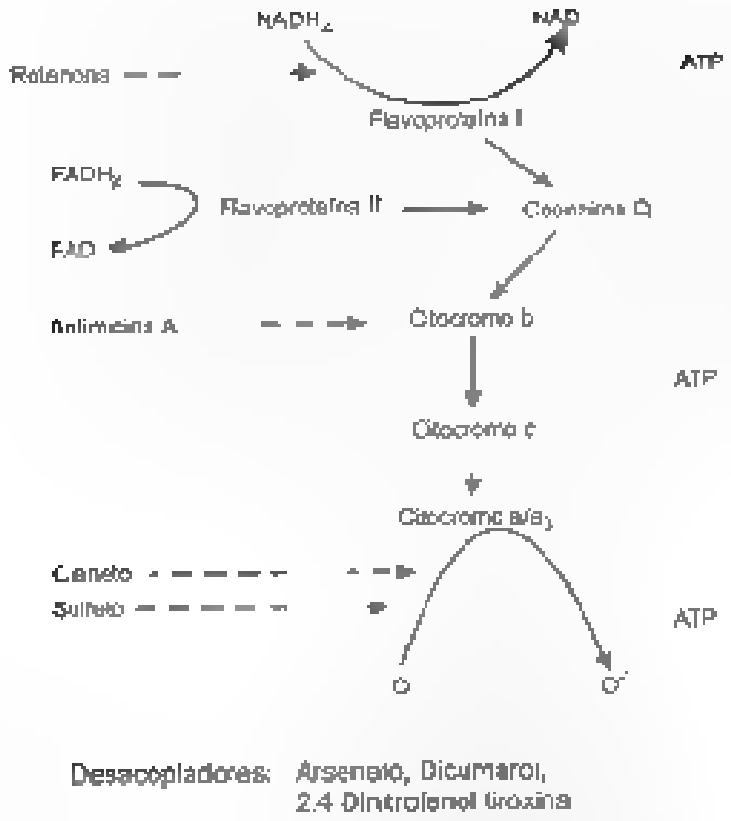


Figura 6.10 Cadeia respiratória, transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.

6.2.8.1 – Bactérias acéticas

As bactérias acéticas do gênero Acetobacter são organismos estritamente aeróbios, que obtêm ATP a partir da oxidação do etanol até ácido acético.

$$\underset{\text{etanol}}{CH_3CH_2OH} + \text{Coenzima ox} \rightarrow \underset{\text{acetaldeído}}{CH_3CHO} + \text{Coenzima red.} \quad (6.20)$$

$$CH_3CHO + \text{Coenzima ox.} \xrightarrow{H_2O} \underset{\text{ácido acetaldeído}}{CH_3COOH} + \text{Coenzima red.} \quad (6.21)$$

As coenzimas reduzidas são transferidas para citocromos da cadeia respiratória, gerando força protonmotiva para a formação de ATP. O ácido acético é excretado, podendo atingir concentrações elevadas no meio, por exemplo de 100 g/L em condições ideais de oxigenação.

Se etanol não está mais disponível, o ciclo de Krebs passa a operar de modo completo e o ácido acético pode ser oxidado até gás carbônico e água.

6.3 – Biossíntese

6.3.1 – Carboidratos

Bactérias e leveduras em meio ausente de carboidratos como acetato, glicerol, hidrocarbonetos e ácidos graxos são capazes de produzir carboidratos, utilizando-se do *ciclo do glioxalato* para formação de succinato e atividade de gluconeogênese com as enzimas reversíveis da glicólise, como pode ser observado nas Figs.6.11 e 6.12.

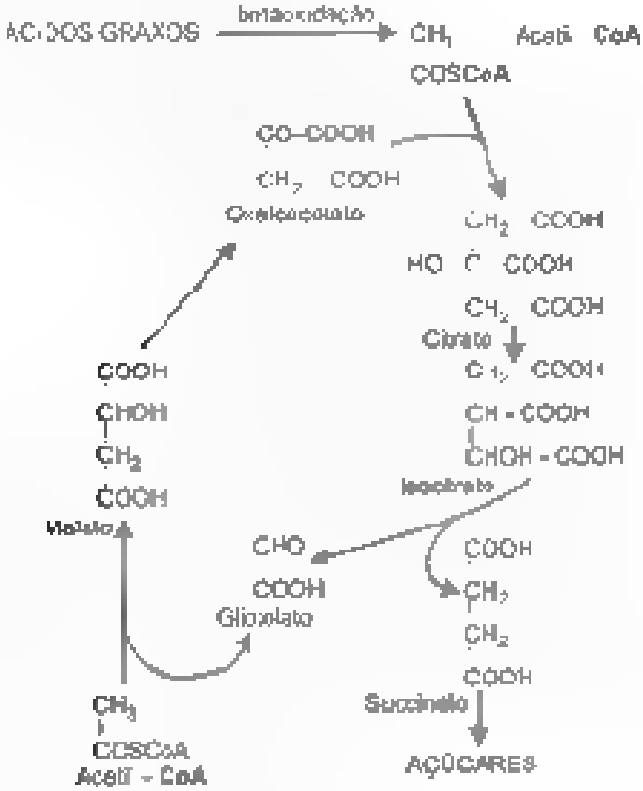


Figura 6.1 Ciclo do glioxalato

A trehalose (dissacarídeo não redutor constituído por duas unidades de glicose unidas pelo carbono anomérico) é um carboidrato com função de proteção contra agentes estressantes e de reserva nas células vegetativas de leveduras e esporos de fungos.

A biossíntese da trehalose é realizada pelas enzimas sintetase de trehalose-P e trehalose-P fosfatase a partir de glicose, como esquematizado.

Ação da hexoquinase e fosfoglicomutase

glicose + ATP ⟶ glicose-6P (6.22)

glicose-6P → glicose-1P (6.23)

Ação da pirofosforilase

glicose-1P + UTP → UDP-glicose + PPi (6.24)

Ação da sintetase de trehalose-P

UDP-glicose + glicose-6P → trehalose-P + UDP (6.25)

Ação da trehalose-P fosfatase

trehalose-P → trehalose + Pi (6.26)

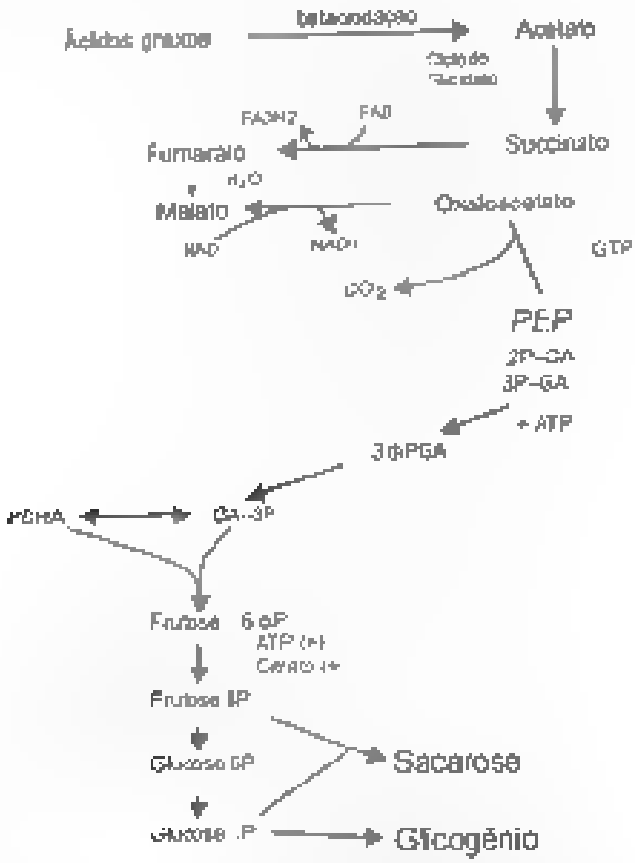


Figura 6.12 – Gliconeogênese

6.3.2 – Ácidos graxos

O sistema para síntese de ácidos graxos saturados a partir de acetil-CoA está localizado no citosol. A acetil-CoA carboxilase, inibida por acil-CoA de cadeia longa, é o primeiro passo para a síntese, produzindo malonil-CoA a partir de acetil-CoA e exigindo o ATP e biotina, sendo ativada por citrato e frutose 2,6-di-P.

$$\text{Acetil-CoA} + CO_2 \rightarrow \text{malonil-CoA} \quad (6.27)$$

O complexo enzimático da sintetase de ácidos graxos realiza a condensação do malonil e exige que o radical acetil esteja ligado ao grupo sulfidrila da proteína carregadora de grupos acil (ACP), de modo semelhante ao que ocorre com a coenzima A. Resumidamente, o processo pode ser esquematizado com as seguintes passagens:

Acetil-SACP + malonil-SACP → acetoacetil-SACP + CO_2 (6.28)
(iniciador)

Acetoacetil-SACP + NADPH + H$^+$ → D(-) beta-OH-butiril-SACP (6.29)

D(-) beta-oh-butiril-SACP → crotonil-SACP (6.30)

Crotonil-SACP + NADPH + H$^+$ → butiril-SACP (6.31)

Butiril-SACP retorna para a reação (6.28) para mais uma incorporação de malonil e o processo se repete até a formação de ácido miristico (14 carbonos) ou ácido palmítico (16 carbonos).

6.3.3 Poli-OH-alcanoatos

São polímeros produzidos principalmente por bactérias com a função de reserva de carbono ou de energia. A produção é estimulada em determinadas condições, como por exemplo a deficiência de nitrogênio, e pode atingir até 80% do material celular seco.

Bactérias do gênero *Alcaligenes* são capazes de produzir poli-OH-butirato a partir de glicose e sacarose; o gênero *Beijerinckia* a partir de glicose, frutose, sacarose e glicerol; e *Rhodococcus rubber* produz um copolímero de poli-hidroxibutirato com 3-OH-valerato, mediante a adição de ácido propiônico ao substrato constituído por glicose ou sacarose, segundo o seguinte esquema:

Propionato + HS-CoA → Propionil-SCoA + AMP + Ppi (6.32)

Entner-Doudoroff
Glicose → → → → Acetil-SCoA (6.33)

Propionil-SCoA + Acetil-SCoA → 3-cetovaleril-SCoA (6.34)

↓ NADPH + H$^+$
D(-)3-OH-valeril-SCoA

↓ Polimerase

POLÍMERO

Poli-OH butirato é um polímero do D(+)-beta-OH butirato com peso molecular entre 60 000 e 250 000. É considerado como reserva de energia característica de procariotos como *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas marinorubra*, *Rhodospirillum rubrum*, *Sphaerotilus natans* e outros de modo geral e bactérias fototrópicas. Acumula-se na célula, como grânulos cercados por membranas, em condições de deficiência de nitrogênio. As reações de síntese estão apresentadas na sequência:

$$2\,CH_3\text{-}CO\text{-}SCoA \rightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}SCoA \xrightarrow{+\ NADH} CH_3\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}SCoA$$

Acetil-CoA → Acetoacetil-CoA → beta-OH-butril-CoA

↓

POLI-OH-BUTIRATO

Referências bibliográficas

Citadas

1. KISHLANDT, N. R.; ASTHEIMER, F. J. Journal American Chemical Society, v. 72, p. 983-985, 1950.

2. NORDSTROM, K. Yeast growth and gluconic formation. Acta Chemica Scandinavica, v. 20, n.4, p.1016-1025, 1966.

3. SUIRA, F. Reaction products of yeast fermentations. Process Biochemistry, v. 3, p. 9-18, 1979.

4. WEBB, A. D.; INGRAM, J. L. Fuel Oil. Advances in Applied Microbiology, v. 5, p. 77-93, 1963.

5. GAYTON, C. A.; K. Bacterial metabolism. 2 ed. Nova York: Springer-Verlag, 1986.

Recomendadas

CROCOMO, O. J. Transformações metabólicas em microrganismos. 1967. Bol. Inst. Pesq. Tecn. E.Paraná, Curitiba, PR, 1967.

LEHNINGER, A. L. Principles of Biochemistry. Nova York: Worth Publishers, 1982.

7 CINÉTICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Walter Borzani

7.1 – Introdução

A Cinética de Reações Enzimáticas é, a rigor, um caso particular da Cinética Química. Seus objetivos são:

a) medir as velocidades das transformações que se processam;

b) estudar a influência de condições de trabalho (como, por exemplo, concentrações dos reagentes e das enzimas, temperatura, pH, concentrações de ativadores e de inibidores) naquelas velocidades;

c) correlacionar (quer por meio de equações empíricas, quer por meio de modelos matemáticos) as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam;

d) colaborar na otimização do processo considerado;

e) estabelecer critérios para o controle do processo;

f) projetar o reator mais adequado.

Esses objetivos, resumidamente apontados, dispensam comentários adicionais relativos à importância prática desse estudo.

Em um curso de graduação não cabe um estudo aprofundado, com vistas ao exame de todos os casos conhecidos e de todos os importantes parâmetros inerentes a sistemas complexos. Nem se tão somente estudar alguns casos simples, com o principal objetivo de adquirir e consolidar conhecimentos fundamentais indispensáveis a futuros desenvolvimentos. Os interessados em um estudo mais completo poderão consultar a literatura indicada no final deste capítulo.

7.2 – Medida da velocidade

Consideremos o caso em que, em solução aquosa, um dado substrato de fórmula molecular S é transformado em produtos de fórmulas moleculares P, Q, etc., em uma reação catalisada por uma enzima de fórmula molecular E. Esquematicamente:

$$S \xrightarrow{E} P + Q + \ldots$$

Como exemplo, poderíamos citar a decomposição da água oxigenada em água e oxigênio na presença da enzima catalase:

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + \tfrac{1}{2}O_2$$

O primeiro problema que se nos apresenta, ao pretendermos estudar a cinética da reação, é a medida de sua velocidade em condições experimentais conhecidas.

Suponhamos que seja possível, no sistema que nos interessa, medir a concentração do substrato (ou de um dos produtos) durante o desenvolvimento da reação a partir de seu início. Essas medidas conduzirão a curvas do tipo das representadas na Fig. 7.1. Essas curvas nos mostram que a velocidade de consumo do substrato (ou de formação do produto escolhido) varia com o tempo, porque, com a consequência da reação, mudam as condições em que o sistema se encontra. De fato, durante o desenvolvimento da reação, mesmo mantendo-se constantes a temperatura e o pH, a concentração do substrato decresce e a concentração da enzima, levando em conta sua labilidade, também pode diminuir consideravelmente, sem esquecer que, em muitos casos, os produtos formados podem atuar como inibidores da ação catalítica da enzima.

A rigor, portanto, o único instante em que as condições experimentais são conhecidas e constantes é o instante inicial. Por esse motivo, a velocidade da reação enzimática deve ser calculada, sempre que possível, no instante $t = 0$, obtendo-se assim a velocidade inicial da desaparição do substrato (ou de formação do produto, ver Fig. 7.1).

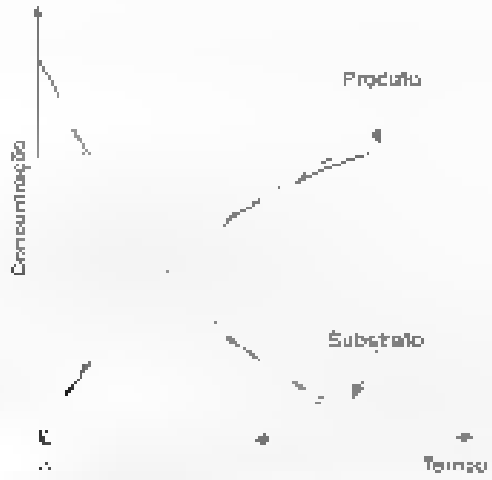


Figura 7.1 [illegible] Medida da velocidade no início e da velocidade média ($t = 0$)

Muitas são as reações enzimáticas cujas velocidades iniciais podem ser determinadas, desde que se tomem os devidos cuidados experimentais. Além da já citada decomposição da água oxigenada, poderíamos citar, a título de exemplos, a sacarose catalisada pela invertase e a hidrólise da uréia, catalisada pela urease.

Há, porém, casos mais complexos, em que a velocidade inicial não pode ser medida, ou porque não existe uma técnica experimental que permita acompanhar as variações das concentrações no sistema em estudo, ou porque a transformação não pode ser representada por uma equação química com reagentes e produtos bem definidos. A velocidade da reação nesses casos é frequentemente representada por uma *velocidade média* de consumo, ou de produção, de substâncias convenientemente escolhidas (ver Fig. 7.2), ou ainda, de variação de uma propriedade do sistema (viscosidade, textura, absorbância, etc.) em um intervalo de tempo pretixado. O amolecimento de carnes pela ação da papaína é um exemplo de processo enzimático em que não há condições de medir uma velocidade inicial.

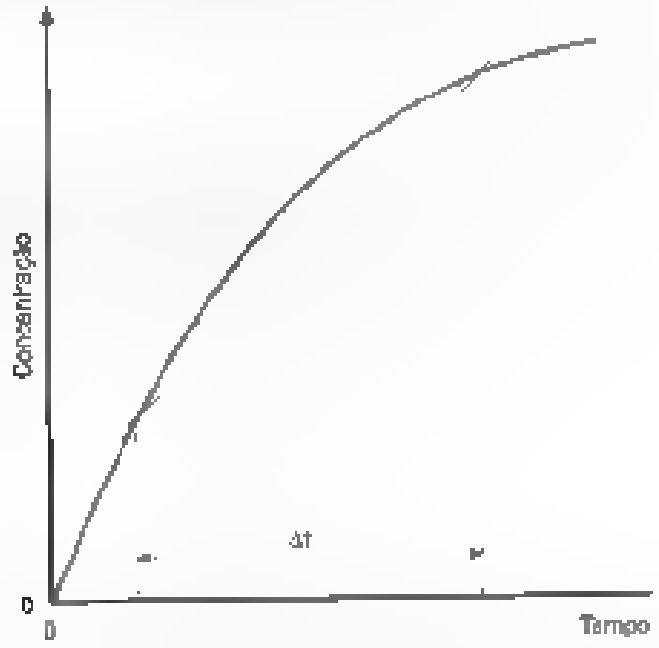


Figura 7.2 Medida da velocidade média de variação [illegible] no tempo Δt.

7.3 – Influência das concentrações da enzima e do substrato. Lei de Michaelis e Menten.

Consideremos uma dada reação enzimática cuja *velocidade inicial* pode ser determinada experimentalmente. Imaginemos vários ensaios, diferentes um do outro *apenas* pela concentração inicial da enzima. A experiência mos-

tra que, dentro de certos limites, a velocidade da reação é proporcional à concentração da enzima (Fig. 7.3).

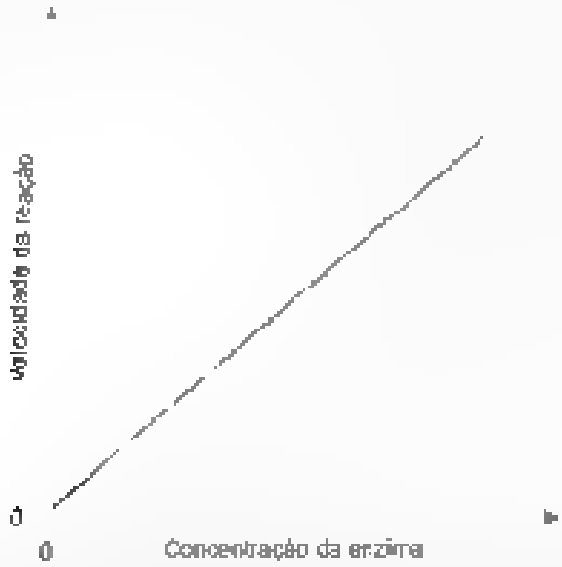


Figura 7.3 Representação esquemática da relação entre a concentração da enzima e a velocidade da reação.

Se, porém, os ensaios realizados diferirem entre si apenas pela concentração inicial do substrato, a velocidade inicial da reação será alterada, como indica a Fig. 7.4. Em outras palavras, a curva obtida é análoga à que se observa em fenômenos em que ocorre saturação: a velocidade da reação é função crescente da concentração do substrato até um determinado valor dessa concentração, mantendo-se praticamente constante para concentrações de substrato superiores a esse valor.

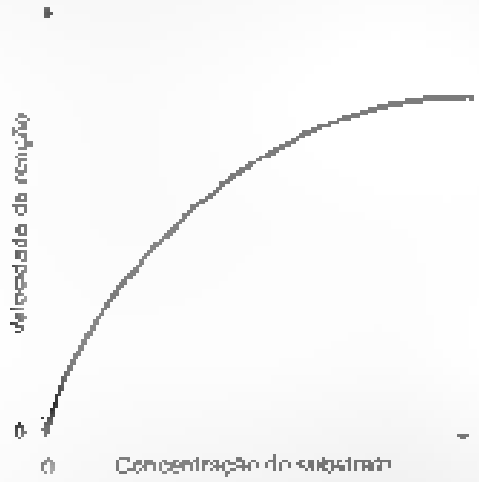


Figura 7.4 Representação esquemática da relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação.

O modelo cinético de Michaelis e Menten é ainda hoje um dos mais aceitos com o objetivo básico de explicar a influência das concentrações iniciais de enzima e de substrato na velocidade inicial da reação enzimática. As hipóteses básicas desse modelo são:

a) o substrato e a enzima reagem reversivelmente entre si formando um composto intermediário denominado *complexo enzima-substrato*;

b) o complexo formado ou se decompõe ou reage com outra substância, regenerando a enzima e formando os produtos da reação.

Consideremos o caso mais simples possível, caracterizado pelos seguintes pontos:

a) a formação do complexo enzima-substrato se dá na proporção de 1 mol de substrato para 1 mol de enzima, produzindo 1 mol de complexo;

b) o complexo formado se decompõe sem reagir com outras substâncias existentes no sistema.

Esquematicamente, teremos, em um dado instante t:

$$\underset{e-x}{E} + \underset{s-x}{S} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \underset{x}{ES} \xrightarrow{k_3} E + P$$

sendo:

k_1 = constante de velocidade de formação do complexo

k_2 = constante de velocidade de dissociação do complexo

k_3 = constante de velocidade de decomposição do complexo formando o produto

v = velocidade de formação do produto

s = molaridade inicial do substrato

e = molaridade inicial da enzima

x = molaridade do complexo no instante t

Podemos, então, escrever:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e-x)(s-x) - k_2 x - k_3 x \qquad (7.1)$$

Admitindo o que é muito comum na prática, que a concentração do substrato é muito maior que a da enzima e, portanto, muito maior que a do complexo, podemos desprezar x em relação a s. A eq. (7.1) será, então:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e-x)s - (k_2 + k_3)x \qquad (7.2)$$

Suponda, ainda, que após um regime transiente inicial muito curto (da ordem de alguns microsegundos), a concentração do complexo se mantém constante (hipótese de Briggs e Haldane), isto é, $dx/dt = 0$, a eq. (7.2) fornece

$$x = \frac{k_1 e s}{k_2 + k_3 + k_1 s} = \frac{e s}{K_m + s} \tag{7.3}$$

sendo

$$K_m = (k_2 + k_3)/k_1 \tag{7.4}$$

A eq. (7.3) permite agora calcular a velocidade de formação do produto

$$v = k_3 x = k_3 e \frac{s}{K_m + s} \tag{7.5}$$

O máximo valor da velocidade será alcançado quando toda a enzima se encontrar na forma de complexo, isto é, quando $x = e$. Indicando-se com V essa velocidade máxima, teremos $V = k_3 e$.

Logo, a equação (7.5) nos dará

$$v = V \frac{s}{K_m + s} \tag{7.6}$$

que é a equação de Michaelis e Menten, representada na Fig. 7.5.

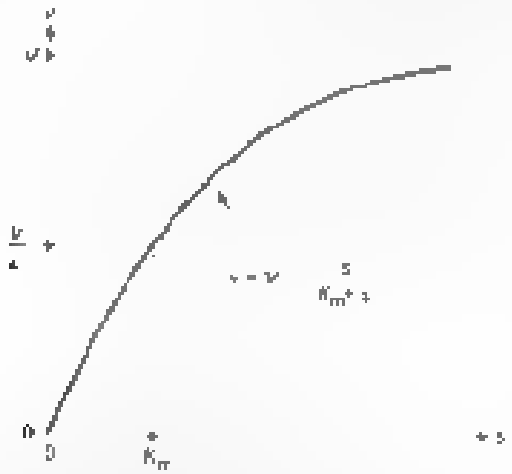


Figura 7.5 Representação esquemática da equação de Michaelis e Menten.

A constante K_m, denominada constante de Michaelis da enzima, ou, segundo alguns autores, constante de Michaelis do substrato, ou ainda constan-

te de Michaelis do sistema enzima-substrato), é a concentração de substrato a qual corresponde uma velocidade igual à metade da máxima. De fato, fazendo $s = K_m$ na equação (7.6), resulta $v = V/2$. A tab. 7.1 reúne alguns valores de K_m.

Tabela 7.1 Valores da constante de Michaelis

ENZIMA	SUBSTRATO	K_m
Invertase	Sacarose	0,020 mol/L
Urease	Uréia	0,025 mol/L
Catalase	H_2O_2	0,025 mol/L
Amilase	Amido	4,0 g/L

Se a constante de velocidade k_2 for muito menor do que k_{-1}, a eq. (7.4) dará:

$$K_m \cong \frac{k_2}{k} \qquad (7.7)$$

isto é, K_m será, neste caso, praticamente igual à constante de equilíbrio de dissociação do complexo *ES*.

Quanto menor for o valor de K_m, maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

A determinação de K_m e V a partir de valores experimentais de s e v pode ser efetuada linearizando-se a eq. (7.6).

Para tanto, um método muito utilizado, chamado método de Lineweaver-Burk, consiste em inverter ambos os membros da eq. 7.6:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V}\frac{1}{s} \qquad (7.8)$$

Essa última equação nos diz que $1/v$ varia linearmente com $1/s$. Os coeficientes linear e angular dessa reta são iguais a $1/V$ e K_m/V, respectivamente.

Tendo-se os valores experimentais de s e os correspondentes valores de v determina-se por regressão linear os valores de $1/v$ e K_m/V e, consequentemente, V e K_m (ver Fig. 7.6).

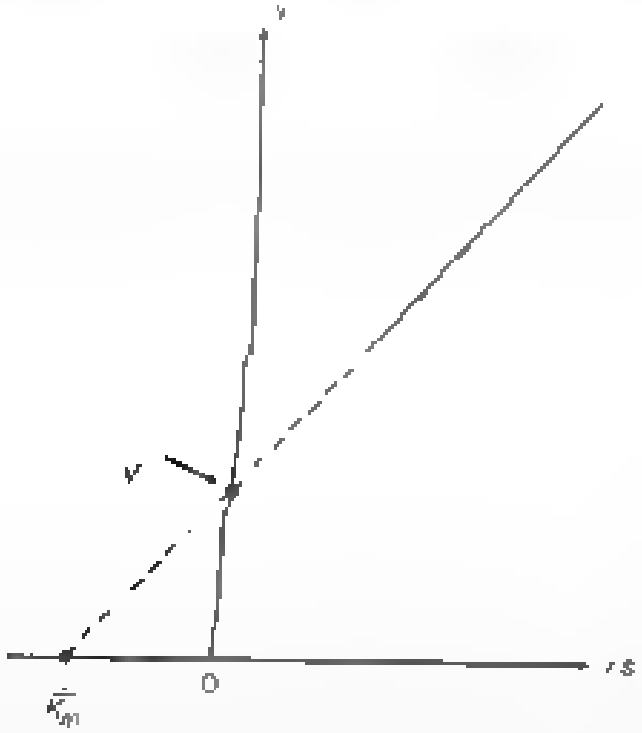


Figura 7.6 Representação esquemática da determinação de V e K_m pelo método de Lineweaver-Burk.

A linearização da eq. (7.6) pode ser realizada por outros métodos, além do de Lineweaver-Burk já citado. Faremos referência apenas a mais um deles, o método de Hanes, que consiste simplesmente em multiplicar por s ambos os membros da eq. (7.8):

$$\frac{s}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V}\, s \qquad (7.9)$$

Neste último método s/v varia linearmente com s e os coeficientes linear e angular da reta correspondente são respectivamente iguais a K_m/V e $1/V$.

Qualquer que seja o método utilizado, uma boa determinação de K_m e V requer uma cuidadosa análise estatística dos valores experimentais.

A título de exemplo, consideremos os valores da Tab. 7.2, que nos dão em uma reação enzimática a velocidade inicial de formação do produto para diversos valores da concentração inicial do substrato (ver Fig. 7.7).

Tabela 7.2 Velocidade inicial de formação do produto em função da concentração inicial de substrato

s (g/L)	v (g/L.h)
0,25	1,78
0,51	1,25
1,02	1,66
2,52	2,19
4,35	2,35
7,25	2,52

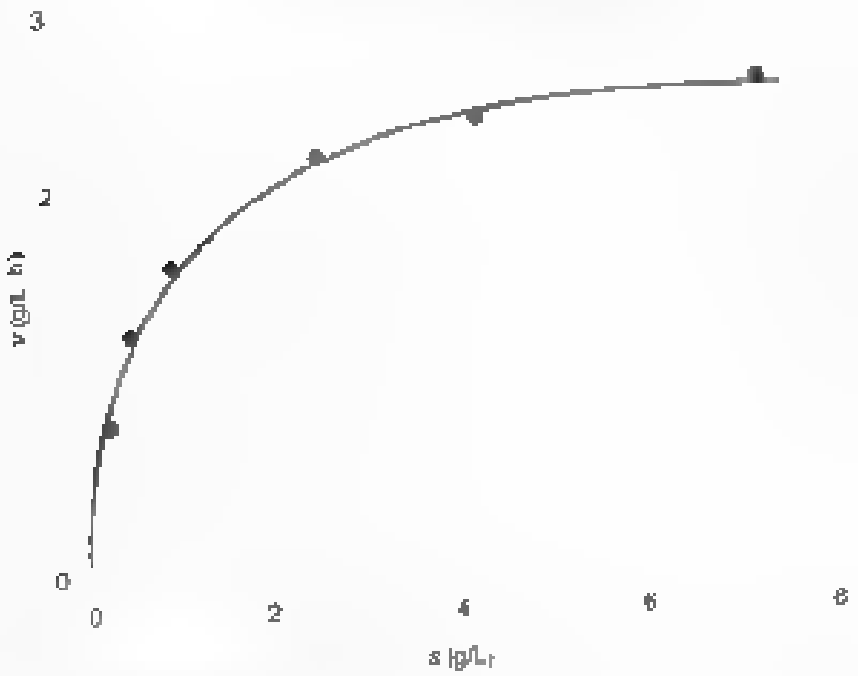


Figura 7.7 Representação gráfica dos valores da Tabela 7.2

Se aplicarmos, aos valores da Tab. 7.2, o método de Lineweaver-Burk e o de Hanes, obteremos os resultados representados, respectivamente nas Figs. 7.8 e 7.9.

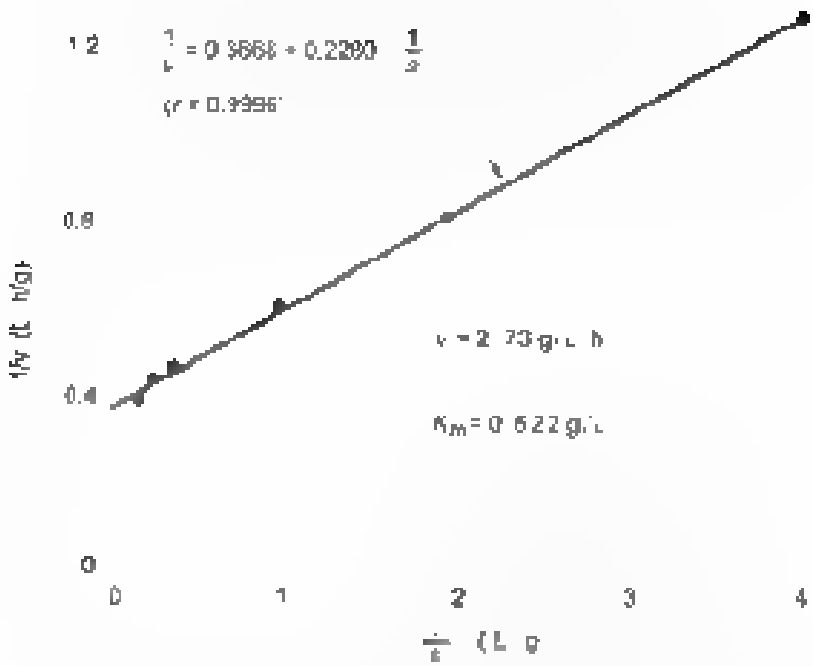


Figura 7.8 Determinação de v e K_m pelo método de Lineweaver-Burk (dados nos valores da Tabela 7.2; r = coeficiente de correlação).

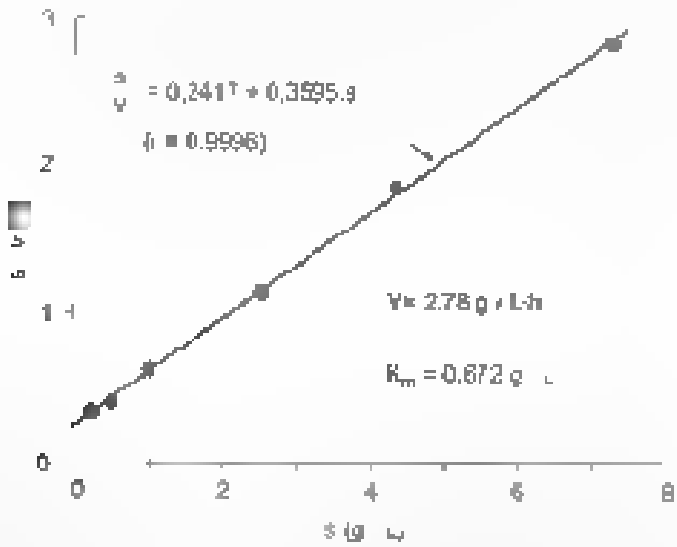


Figura 7.9 Determinação de v e K_m pelo método de Hanes-Woolf (dados nos valores da Tabela 7.2; r = coeficiente de correlação).

Resta-nos examinar a ordem da reação enzimática em duas situações particulares.

Se a concentração do substrato for muito menor que K_m, isto é, se $K_m + s \cong K_m$, a eq. (7.6) nos dará:

$$v \cong \frac{V}{K_m} \cdot s$$

isto é, a reação se comporta como se fosse de primeira ordem.

Se, porém, a concentração do substrato for muito maior do que Km, de modo que $Km + s \cong s$, teremos, pela eq. (7.6),

$$v \cong V$$

ou seja, a reação se comporta como se fosse de ordem zero.

7.4 – Influência da presença de um inibidor

Chama-se inibidor da reação enzimática uma substância que acarreta a diminuição da velocidade da reação.

Quando o inibidor reage irreversivelmente com a enzima, bloqueando-a parcial ou totalmente, a inibição é do tipo denominado irreversível. Se, porém, o inibidor reage reversivelmente com a enzima, a inibição é do tipo chamado reversível. Esse último caso é o que tem interesse prático e, por este motivo, será considerado neste item.

Cumpre destacar que, em alguns casos, o inibidor pode ser uma das substâncias que participa da reação, quer como substrato, quer como produto. Assim, por exemplo, a invertase (que catalisa a hidrólise da sacarose, formando glicose e frutose) pode ser inibida pela sacarose quando esta se encontra presente em concentrações relativamente altas, enquanto a alfaamilase (que catalisa a hidrólise do amido produzindo dextrinas e maltose) é inibida pelas dextrinas e pela maltose.

Consideraremos, entre os muitos tipos de inibição reversível de reações enzimáticas, apenas dois: inibição competitiva e inibição não-competitiva.

Comecemos pela inibição competitiva.

Diz-se que um inibidor é competitivo quando compete com o substrato, ocupando o sítio ativo da enzima.

Indicando-se com I a fórmula molecular do inibidor e com sua molaridade, ou, o modelo de Michaelis e Menten, no caso mais simples possível, pode ser representado pelas seguintes equações químicas:

$$\underset{v}{E} + \underset{v}{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \underset{v}{ES} \underset{k_2}{\overset{k_2}{\longrightarrow}} E + P$$

$$\underset{v}{E} + \underset{v}{I} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \underset{v}{EI}$$

onde v = velocidade de formação do produto P é obviamente menor que v (ver item 7.5), uma vez que parte da enzima está "bloqueada" da reação com o inibidor.

Teremos então uma vez que na prática, $s >> x$ e $s >> y$

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e - x - y)s - (k_2 + k_3)x \qquad (7.10)$$

$$\frac{dy}{dt} = k_4(e - x - y)i - (k_5 + k_6)y \qquad (7.11)$$

Cumpre destacar que na reação entre a enzima e o inibidor pode não ocorrer a formação do produto P, isto é, pode-se ter apenas

$$E + I \underset{k_5}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} EI$$

e conseqüentemente $k_6 = 0$

Sendo $dx/dt = dy/dt = 0$ (ver item 7.3, hipótese de Briggs e Haldane) as eqs. (7.10) e (7.11) nos darão

$$x = \frac{e \cdot s}{K_m(1 + i/K_i) + s} \qquad (7.12)$$

sendo $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ e $K_i = (k_5 + k_6)/k_4$

A velocidade v_s será, então:

$$v_s = k_3 x = V \frac{s}{K_m(1 + i/K_i) + s} \qquad (7.13)$$

onde $V = k_3 e$

Aplicando-se na equação (7.13) o método de Lineawer-Burk, teremos

$$\frac{1}{v_s} = \frac{1}{V} + \frac{K_m(1 + i/K_i)}{V}\frac{1}{s} \qquad (7.14)$$

representada esquematicamente na Fig. 7.10

A eq. (7.14) pode ainda ser graficamente representada colocando-se em abcissas, a concentração do inibidor em vez de s, como nos mostra a Fig. 7.1. Pode-se aqui demonstrar que as retas obtidas para diferentes concentrações de substrato cruzam-se no ponto de abcissa $-K_i$ e ordenada $1/V$

As eqs. (7.6) e (7.13) nos permitem calcular a relação entre as velocidades da reação sem inibidor e com inibidor

$$\frac{v_o}{v_s} = 1 + \frac{K_m}{K_i}\left(\frac{i}{K_m + s}\right) \qquad (7.15)$$

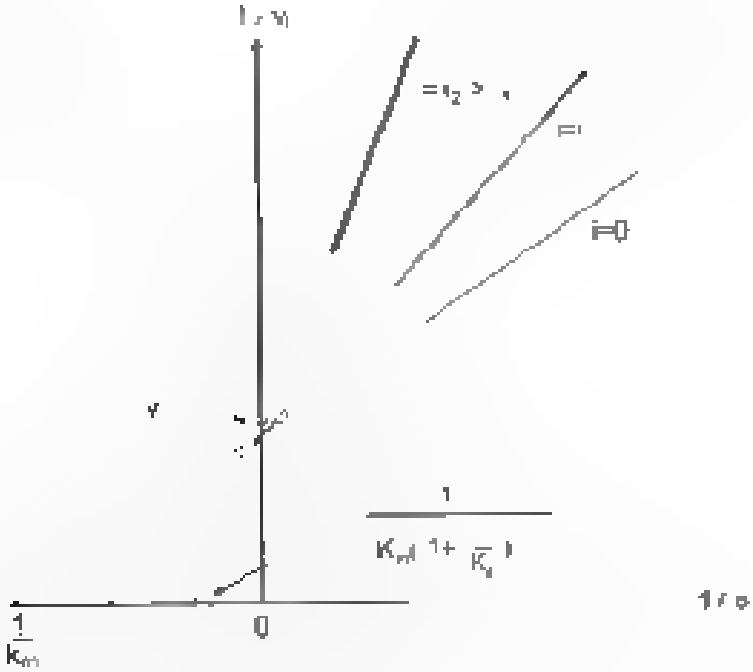


Figura 7.10 Representação esquemática da aplicação do método de Newton-Raphson [illegible] competitivo

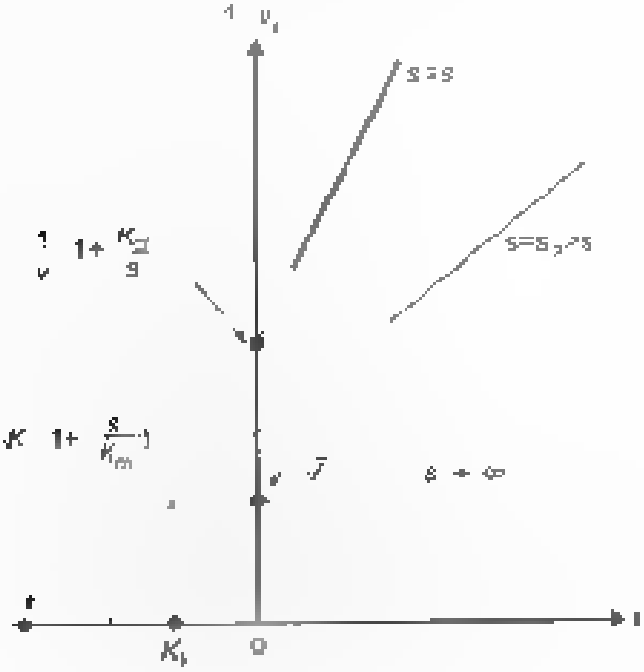


Figura 7.11 Representação esquemática da aplicação do método de Newton-Raphson [illegible] de inibição competitiva. Determinação do K

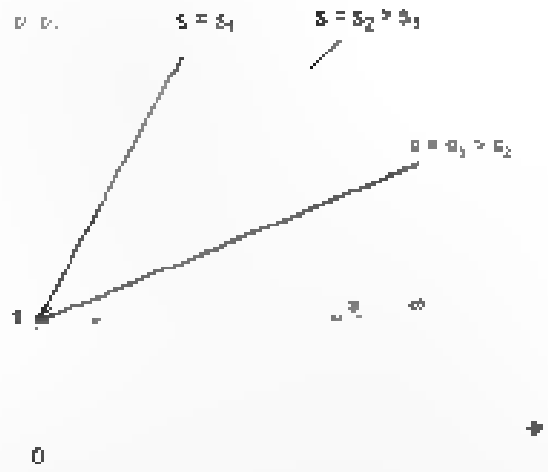


Figura 7.12 Representação esquemática da influência das concentrações do substrato e do inibidor competitivo na relação v/v

Essa última equação, representada na Fig. 7.12, nos mostra a influência das concentrações do substrato e do inibidor na relação v/v. Em particular, se for possível trabalhar com concentrações de substrato relativamente altas (matematicamente, $S \to \infty$) a influência do inibidor pode se tornar desprezível. Essa tendência pode ser também observada no exemplo numérico representado na Fig. 7.13, no qual, V=6,0 mg/L min, K_m=2,50 mg/L e K=1,60 mg/L.

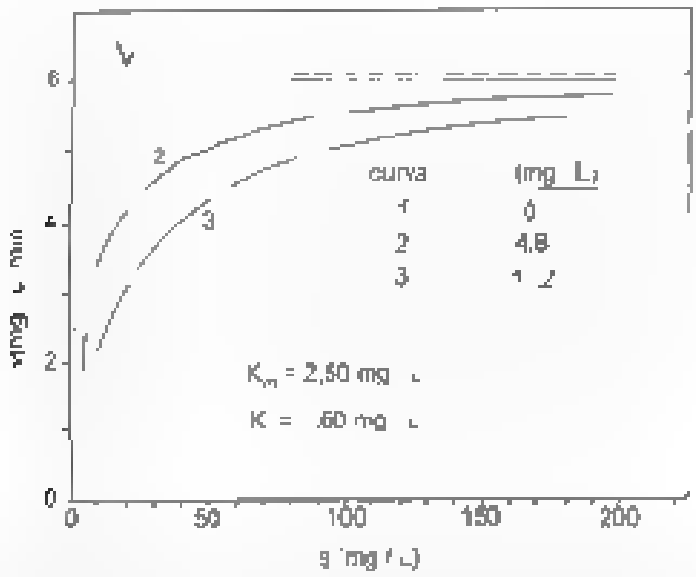


Figura 7.13 Exemplo numérico da influência das concentrações do substrato e do inibidor competitivo na velocidade da reação

Um exemplo de inibição competitiva é o observado no efeito inibidor da glicose na hidrólise da sacarose catalisada pela invertase. A inibição, provocada pela a-dextrina na hidrólise do amido catalisada pela alfaamilase, é outro exemplo de inibição competitiva.

Uma vez examinados os pontos fundamentais da influência de um inibidor competitivo na velocidade da reação enzimática, passemos ao exame de um caso simples de inibição não competitiva.

Nesse tipo de inibição, o inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo, mas vai ocupar outro sítio da enzima (sítio regulativo ou de inibição) como indicado, esquematicamente, a seguir:

$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

$$ES + I \rightleftharpoons EIS$$

$$EI + S \rightleftharpoons EIS$$

formando-se, além dos complexos ES e EI, um terceiro complexo, enzima-inibidor-substrato (EIS).

A velocidade da reação enzimática será, neste caso:

$$v = V \frac{K_i}{K_i + i} \frac{s}{K_m + s} \qquad (7.16)$$

Como exemplos de inibição não competitiva podem ser citados os efeitos inibidores, tanto da maltose quanto da dextrina limite na hidrólise do amido catalisada pela alfa-amilase.

Finalmente, parece-nos aconselhável examinar o caso de inibição não competitiva irreversível, ou seja, quando o inibidor reage irreversivelmente com a enzima bloqueando-a em parte, como acontece quando o inibidor é um metal pesado.

Sendo i a molaridade inicial do inibidor e x indicando com x a molaridade de enzima por ele bloqueada, o modelo de Michaelis e Menten pode ser representado pelas seguintes equações quimicas:

$$\underset{r}{E} + \underset{s}{S} \underset{k_1}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \underset{c}{ES} \xrightarrow[k_3]{k_2} E + P$$

Considerando que $s = r = s$, podemos escrever:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e - x - z)s - (k_2 + k_3)x = 0 \qquad (7.17)$$

Logo:

$$x = \frac{(e - z)s}{K_m + s} \qquad (7.18)$$

onde: $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$

Teremos, então

$$v = k_3 x = (k_3 e - k_3 z)\frac{s}{K_m + s} \qquad (7.19)$$

Considerando que $k_3 e = V$, resulta:

$$v = (V - k_3 z)\frac{s}{K_m + s} \qquad (7.20)$$

representada graficamente na Fig. 7.14

Figura 7.14 Representação esquemática da influência da concentração de substrato na velocidade da reação na presença de um inibidor acompanhado que reage reversivelmente com a enzima.

A aplicação do método de Lineaweaver-Burk à eq. (7.20) nos dá

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V - k_3 z} + \frac{K_m}{V - k_3 z}\frac{1}{s} \qquad (7.21)$$

esquematicamente representada na Fig. 7.15

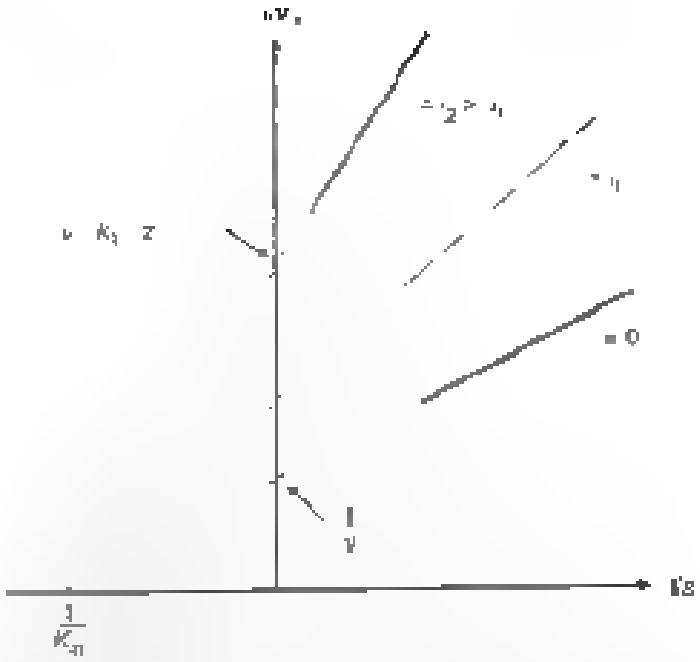


Figura 7.5 Representação esquemática da operação do método de Lineweaver-Burk no caso da inibição competitiva, em que as linhas pequeno-tracejadas referem-se à presença do inibidor.

As eqs. (7.13) e (7.16) nos mostram ainda que enquanto na inibição competitiva a velocidade máxima não é afetada e a constante de Michaelis é multiplicada por um fator maior que 1, na inibição não-competitiva a constante de Michaelis não é afetada e a velocidade máxima é menor do que V.

7.5 – Influência da temperatura

Na reação enzimática

$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k} E + P$$

a constante de velocidade k, dentro de certos limites, é função crescente da temperatura do sistema.

A experiência mostra que a influência da temperatura na constante de velocidade k obedece à lei de Arrhenius, representada pela eq. (7.22) e pela Fig. 7.16:

$$k = k_0 \, e^{-\varepsilon/RT} \qquad (7.22)$$

onde ε é a energia de ativação, R é a constante dos gases perfeitos e T é a temperatura absoluta do sistema.

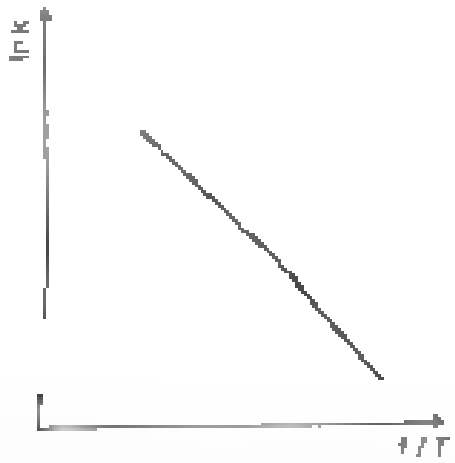


Figura 7.14 Representação esquemática da variação da constante de velocidade (k) com a temperatura absoluta (T)

Lembrando, porém, que as enzimas são termolábeis, ao mesmo tempo que ocorre a reação enzimática que nos interessa, desenvolve-se também a reação de inativação térmica da enzima que atua no sistema.

$$E \xrightarrow{k} \text{Enzima inativada}$$

e a constante de velocidade desta reação (k) também é afetada pela temperatura de acordo com a lei de Arrhenius.

$$k = k \quad e^{-\beta/RT} \tag{7.23}$$

sendo β a correspondente energia de ativação.

A experiência mostra que, enquanto o valor de α se situa no intervalo 4 a 20 kcal/mol, o de β é consideravelmente maior, atingindo 40 a 200 kcal/mol.

Levando em conta esses fatos, suponhamos uma dada reação enzimática com α = 12 kcal/mol e β = 120 kcal/mol, desenvolvendo-se a 20°C e a 30°C. Tanto o valor de k_P quanto o de k aumentam quando a temperatura passa de 20°C a 30°C, e as eqs. (7.22) e (7.23) permitem calcular esses aumentos: enquanto k_P (constante de velocidade de formação do produto) se torna aproximadamente 2 vezes maior, k (constante de velocidade de inativação térmica da enzima) se torna cerca de 860 vezes maior. Compreende-se, assim, por que motivo a elevação da temperatura acima de um certo valor acarretará, devido às altas velocidades de inativação térmica da enzima, diminuição da velocidade de formação do produto. Gráficos como o da Fig. 7.17 representam esse fenômeno.

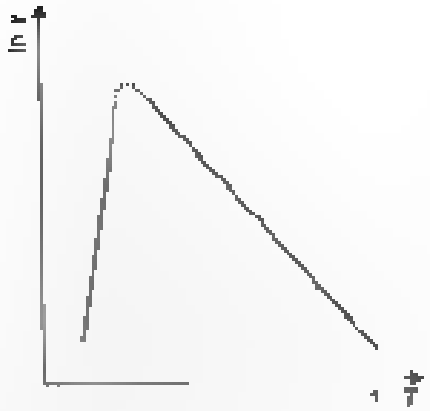


Figura 7.17 Representação esquemática da influência da carga elétrica da enzima sobre a velocidade de formação do produto.

7.6 – Influência do pH

Partindo-se do fato, bem conhecido, de que o pH do meio aquoso em que se desenvolve uma reação enzimática afeta tanto o estado de ionização da enzima quanto a velocidade da reação, pode-se supor que a atividade catalítica da enzima depende de seu estado de ionização.

Imaginemos, então, o seguinte sistema relativamente simples:

1) A enzima se encontra em três estados de ionização, representados por $E^{(0)}$, $E^{(-1)}$ e $E^{(-2)}$;

2) Somente $E^{(-1)}$ apresenta atividade catalítica.

3) Os seguintes equilíbrios coexistem no sistema:

$$E^{(0)} \rightleftarrows E^{(-1)} + H^+ \qquad\qquad E^{(-1)} \rightleftarrows E^{(-2)} + H^+$$

e as respectivas constantes de equilíbrio são K_1 e K_2.

4) As molaridades de $E^{(0)}$, $E^{(-1)}$, $E^{(-2)}$ e H^+ são, respectivamente: e_0, e_1, e_2 e h;

5) A molaridade total da enzima presente no sistema é e.

Podemos, então, escrever:

$$K_1 = \frac{h\ e_1}{e_0} \tag{7.24}$$

$$K_2 = \frac{h\ e_2}{e_1} \tag{7.25}$$

$$e = e_0 + e_1 + e_2 \tag{7.26}$$

que nos permitem calcular a concentração da fração da enzima que apresenta atividade catalítica em função de [illegible] concentração total da enzima no sistema e de k_1 e consequentemente, do pH. O valor de e vai determinar o valor da de v na eq. (7.5)

7.7 – Comentários finais

No início deste capítulo tivemos o cuidado de informar que não seriam examinados, aqui, todos os temas que integram o vasto campo da cinética dos processos enzimáticos.

Em particular, não fizemos referência aos casos em que se utilizam enzimas imobilizadas, cuja importância vem crescendo consideravelmente. Esse assunto será examinado nos Volumes 2 e 3 desta coleção.

Outro tópico que, por seu potencial interesse prático vem merecendo atenção crescente é o da ação catalítica de enzimas em meios não-aquosos.

A literatura que indicamos a seguir poderá ser consultada para um primeiro aprofundamento dos estudos.

Literatura recomendada

(1) BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. McGraw-Hill, N. York (1986).

(2) DIXON, M. & WEBB, E. C. **Enzymes**. 3ª Edição. Academic Press, N. York (1979).

(3) LLANOS, J. **Biotecnologia de Enzimas**. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso (1986).

(4) LAIDLER, K. J. & BUNTING, P. S. **The Chemical Kinetics of Enzyme Action**. 2ª Edição, Clarendon Press, Oxford (1973).

(5) SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics**. Wiley-Interscience, N. York (1975).

8 TERMODINÂMICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Otto J. Crocomo e Luiz Carlos Basso

8.1 – Introdução

Hoje, mais do que nunca, estamos conscientes de que a *energia*, a capacidade de realizar trabalho, é vital para uma civilização moderna. Nas suas diversas formas, elétrica, mecânica, química, térmica, luminosa etc., é utilizada para a manufatura de produtos, transporte, aquecimento, refrigeração e demais trabalhos.

A célula viva igualmente necessita de energia para a realização dos diversos trabalhos fisiológicos que ela executa: biossínteses (trabalho químico), transporte ativo (trabalho osmótico), contração muscular (trabalho mecânico), bioluminescência etc.

A bioenergética é o campo da bioquímica que trata das transformações e uso da energia pelas células vivas, estando sujeita aos mesmos princípios da termodinâmica, mas as peculiaridades dos sistemas biológicos exigem uma abordagem diferenciada, como será apresentado no presente capítulo.

Em sentido amplo, as células fotossintetizadoras e as heterotróficas alimentam-se mutuamente. As primeiras aproveitam-se do CO_2 atmosférico para produzir carboidratos e devolver O_2 ao meio ambiente. As heterotróficas, por sua vez, utilizam os carboidratos assim produzidos e o O_2 e liberam CO_2 para a atmosfera. A Fig. 8.1 mostra essa interdependência nutricional (simbiofaia), ressaltando-se o acoplamento dos ciclos do carbono e do oxigênio na biosfera: durante a fotossíntese, a energia solar é transformada em energia química sob a forma de ATP, NADPH e carboidratos (glicose), os quais são utilizados pelas células heterotróficas na realização de atividades que consomem energia. A luz solar é, em última análise, a primeira fonte de energia tanto para células autotróficas como heterotróficas.

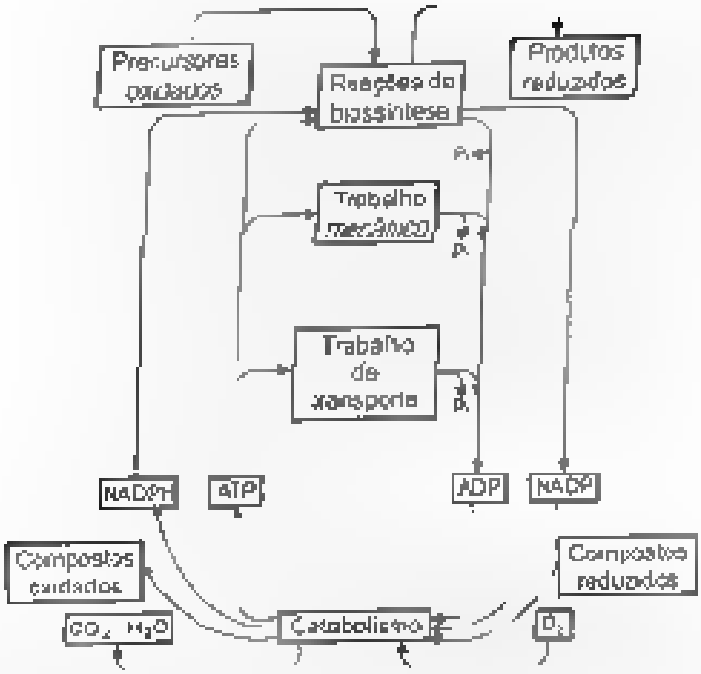


Figura 8.1 O ciclo do ATP/ADP na transferência de elétrons e de grupos através do sistema NADPH/NADP

No ciclo biológico da energia e, portanto, no fluxo de energia na biosfera, estão comprometidas grandes quantidades de energia. Anualmente as células fotossintetizadoras capturam cerca de 10^{21} cal de energia solar e aproximadamente 33×10^{9} t de carbono fluem através do ciclo do carbono na biosfera. Esse fluxo se processa durante o transcorrer do metabolismo, ou seja, durante as reações bioquímicas de degradação de substâncias complexas (catabolismo) e de síntese de compostos complexos (anabolismo). As primeiras reações são acompanhadas pela liberação de energia livre das estruturas complexas de grandes moléculas orgânicas, com a conservação dessa energia sob a forma de ligações ricas de energia do ATP. Por outro lado, nas sínteses enzimáticas de moléculas complexas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos) a partir de precursores mais simples, ocorre aumento no tamanho e complexidade da molécula, levando a uma diminuição na entropia do sistema, exigindo o fornecimento de energia livre proporcionada por ATP.

Tanto catabolismo como anabolismo consistem em dois processos simultâneos e interdependentes. Um deles — o *metabolismo intermediário* — é uma seqüência de reações enzimáticas pela qual o esqueleto covalente de uma biomolécula é degradado ou sintetizado, seus intermediários químicos são chamados *metabólitos*. Cada reação química do metabolismo intermediário é acompanhada por uma variação no conteúdo de energia. Ou seja, em certos passos da seqüência catabólica, pode ocorrer conservação de energia dos metabólitos — usualmente como ATP — e, em certos pontos das reações anabólicas, pode haver necessidade da introdução de energia. Esse processo é

[illegible]

[illegible]

dizer trabalho químico

[illegible]

8.2 - Princípios da Termodinâmica

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] as trocas na composição material

8.2 Conservação de energia

[illegible]

dos produtos. Parte da energia pode ser liberada como calor e parte como trabalho, mas para uma quantidade fixa do reagente a soma do calor e do trabalho sempre será a mesma. Quantitativamente essas considerações podem ser expressas como

$$\Delta E = E_{final} - E_{inicial} \tag{8.1}$$

sendo ΔE a variação na energia quando o sistema vai do estado inicial para o final.

Um sistema fechado pode realizar vários tipos de trabalho sobre seu meio, cujas quantidades podem ser somadas sob a forma W. Trabalho quando então a energia total gasta pelo sistema para fazer o trabalho é $-W$. Ao mesmo tempo em que o sistema isotérmico sob pressão (P) constante perde energia na forma de trabalho ($-W$), ele também adquire energia sob a forma de calor (Q) a partir de seu meio. Nesse caso, a variação em sua energia intrínseca será o resultado da soma da aquisição de energia Q e perda de energia $-W$:

$$\Delta E = Q - W \tag{8.2}$$

onde W é o trabalho feito pelo sistema e Q é calor absorvido pelo sistema. O sinal – indica que o trabalho feito pelo sistema envolve gasto de energia enquanto o sinal + indica que o calor absorvido pelo sistema representa ganho de energia.

A energia pode ser transferida de um sistema para outro seja por meio de fluxo de calor, seja por meio de trabalho. É importante ter em mente que a energia E é uma propriedade característica de um sistema. Fluxo de trabalho e calor não são propriedades de um sistema, mas constituem meios pelos quais a energia é transferida quando ocorre a troca.

Apesar da existência de muitos tipos de trabalho, em Química os mais significativos são o trabalho elétrico e o realizado pelos gases em expansão. Trabalho elétrico pode ser produzido por células eletroquímicas, enquanto que trabalho em expansão resulta de uma variação no volume dos sistemas envolvidos e é usualmente chamado de trabalho pressão-volume (trabalho PV).

Para qualquer sistema isolado fechado que não realiza outro trabalho sobre seu meio senão aquele que deriva de sua expansão, temos:

a) volume constante,

$$E\Delta = Q_v \text{ (não pode se expandir;)} \tag{8.3}$$

b) pressão constante,

$$E\Delta = Q_p - P\ \Delta V \tag{8.4}$$

Q_v é o calor absorvido sob volume constante quando nenhum trabalho é realizado. Q_p o calor absorvido sob pressão constante quando nenhum trabalho é realizado além do trabalho pressão-volume de expansão $P\ \Delta V$ o trabalho pressão-volume realizado pelo sistema sobre seu meio como consequência da expansão, e ΔE o aumento na energia interna.

Considerando-se também todas as outras formas de trabalho (W') a primeira lei pode ser assim escrita

$$\Delta E = Q - P\ \Delta V - W' \tag{8.5}$$

Entretanto, se $W' = 0$,

$$\Delta E = Q - P\ \Delta V \tag{8.6}$$

Essa expressão da primeira lei é a mais útil aos químicos.

8.2.2 – Entalpia

A energia interna (E) de um sistema é um atributo que depende do estado presente do sistema, é uma função de estado. Não se pode medir o valor de E de um sistema fechado em um estado qualquer, mas é possível medir-se a diferença entre os valores que E adquire em dois estados, obtendo-se ΔE. Isso porque, sob T e P constantes, $\Delta E = Q - W$. As vias pelas quais essa variação tem lugar podem ser várias e, em cada uma delas, Q e W têm valores únicos.

Sob pressão constante, o valor de Q pode ser calculado a partir da equação

$$Q_p = \Delta E + W \tag{8.7}$$

e, então,

$$Q_p = \Delta E + P\ \Delta V \tag{8.8}$$

Como a energia vai de um estado 1 para um estado 2, a Eq. (8.8) pode ser assim reescrita

$$Q_p = (E_2 - E_1) + (PV_2 - PV_1) \tag{8.9}$$

que nos dá

$$Q_p = (E_2 + PV_2) - (E_1 + PV_1) \tag{8.10}$$

Desse modo, o calor associado com um processo que ocorre sob pressão constante pode ser obtido pela diferença entre dois termos $E + PV$.

Ora, Q_p é uma função de estado e, portanto, pode ser expressa como a diferença dos valores de uma propriedade de estado entre os estados inicial e final. É o que indica a Eq. 8.10. A função $E + PV$ recebe o símbolo H, e é chamada de *conteúdo total de calor* ou *entalpia* do sistema. Para um dado processo que se desenvolve sob pressão constante, o calor liberado ou absorvido é medido pelo termo ΔH, que é a variação na entalpia do sistema durante o processo:

$$\Delta H = Q_p = H_2 - H_1 \qquad (8.11)$$

H é uma função de estado e pode ser expressa em termos de E, P e V, sendo cada um deles também uma função de estado.

Se, sob condição de P constante, calor é liberado no meio, o sistema deve decrescer em entalpia, ΔH será negativo, a reação química é chamada exotérmica. Se calor é absorvido pelo sistema, ha um aumento na entalpia, ΔH será positivo, e a reação química é chamada de endotérmica.

8.2.3 – Energia Livre

Algumas limitações quanto ao tipo de transformações de energia que ocorrem em processos químicos ou físicos são impostas pela segunda lei da Termodinâmica, a qual prediz em que direção um dado processo provavelmente se dará. Essa lei estabelece que "reações espontâneas são aquelas que, quando realizadas sob condições apropriadas, podem realizar trabalho útil". Esse trabalho útil é expresso pela nova energia livre, sugerida por Gibbs, que é o potencial máximo do sistema quando sob T e P constantes. A variação no valor de G é simbolizada como ΔG.

Geralmente se supõe que, quando um sistema sob T e P constantes perde calor para seu meio, ele também deva estar sofrendo uma transformação espontânea. Se esse fosse o caso, todas as reações exotérmicas seriam espontâneas. Por outro lado, supõe-se também que as reações endotérmicas não ocorram espontaneamente. Na realidade, nem uma dessas suposições é correta, pois a variação de calor que acompanha uma reação, sob P e T constantes, ou seja, ΔH, não é em si mesma uma medida real da capacidade de uma reação produzir trabalho útil. É o sinal de ΔG que indica se uma reação é capaz de realizar outro trabalho além do trabalho P. Se ΔG é negativo, o sistema terá perdido energia livre, a qual pode ter sido utilizada para realização de trabalho. Se for positivo, o sistema terá ganho energia livre e a reação não pode realizar trabalho útil. No primeiro caso, a reação é chamada de exergônica e no segundo caso, de reação endergônica. A segunda lei, portanto, diz que uma reação espontânea é caracterizada pela perda de energia livre. Ela também prediz que uma reação tomará uma determinada direção, porque não prediz em que velocidade a mesma se dará. Por conseguinte, uma reação termodinâmica pode ser

exotérmica: ΔH é negativo. exergônica: ΔG é negativo,

endotérmica: ΔH é positivo, endergônica: ΔG é positivo,

Assim, [illegible] espontâneas são obrigatoriamente exergônicas.

8.2.4 Entropia

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \qquad (8.12)$$

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Desse modo, em todos os processos, sejam físicos ou químicos, ocorre de portanto no sentido de se aumentar a entropia: parte da energia "útil" (aquela capaz de realizar trabalho) é "degradada" para uma forma de energia "inútil", incapaz de produzir trabalho.

8.2.5 Implicações biológicas

Da Eq. (8.12) e da Eq. (8.13), a qual define entalpia, podem-se extrair certas implicações biológicas:

$$\Delta H = \Delta E + \Delta PV \tag{8.13}$$

As reações químicas dos sistemas biológicos têm lugar em soluções aquosas diluídas sob temperatura, pressão e volume constantes. Quando se trata uma condição na qual ΔPV torna-se zero, então ΔH será igual a ΔE. Nesse caso, pode-se substituir o valor de ΔH na Eq. (8.12) por ΔG (Fig. 8.14):

$$\Delta G = \Delta E - T\ \Delta S \tag{8.14}$$

Essa equação pode ser então transformada em:

$$\Delta E = \Delta G + T\ \Delta S \tag{8.15}$$

Desse modo, sob T e P constantes, a variação na energia total do sistema ΔE, equivalente à variação no calor, é a soma dos termos $T\ \Delta S$ e a variação na energia livre ΔG. À medida que o sistema se aproxima do equilíbrio, a energia livre decresce para o mínimo.

Ora, sob condições de temperatura e pressão constantes no sistema, este troca livremente energia com o meio, não ocorrendo, entretanto, troca na massa. Quando um sistema sofre variação que leva a um equilíbrio, a energia total do sistema + meio permanece constante, apesar de a energia total do sistema sozinho crescer, ficar constante ou decrescer. Ao mesmo tempo, o sistema pode ceder calor para o meio, ou receber calor do meio. Já se sabe, por outro lado, que durante um processo, a entropia do sistema + meio aumenta até alcançar um máximo no ponto de equilíbrio. A força que realmente dirige qualquer processo é a tendência para aumentar a entropia no universo.

A entropia só do sistema não necessariamente aumenta durante um processo que se dirige para um equilíbrio. Seu valor pode aumentar, ficar constante ou decrescer. Se ela decresce, então a entropia do meio deverá aumentar uma quantidade tal que faça com que a soma das variações da entropia do sistema e do meio aumente. É o que acontece quando os organismos vivos crescem: a entropia do organismo (sistema) decresce enquanto a do meio aumenta.

A vida já definida filosoficamente como sendo um conjunto de princípios que resiste à morte, caracteriza-se pela busca e manutenção de estados alta-

mente organizados. Tal organização, seja de moléculas, organelas, células ou tecidos, como formas vivas mais complexas, é atingida às custas da energia obtida do meio. A vida, pois, pode ser entendida como um processo que "luta" contra a entropia, a desorganização, o caos inexorável.

8.2.6. Variação-padrão de energia livre

Consideremos uma reação química bimolecular

$$aA + bB \leftrightarrow cC + dD \tag{8.16}$$

Nessa equação, a, b, c e d são os números das moléculas de A, B, C e D, substâncias químicas que participam da reação. A constante de equilíbrio K para a Eq. (8.16) é

$$K = \frac{[C]^c\,[D]^d}{[A]^a\,[B]^b} \tag{8.17}$$

A partir do conhecimento do valor de K, o valor da variação da energia livre é dado pela expressão

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K \tag{8.18}$$

onde ΔG° é a *variação-padrão de energia livre*. Seu valor é obtido quando a reação se processa à temperatura de 25°C e todos os componentes da reação estão em seu estado-padrão. O estado-padrão é uma condição de referência conveniente na qual as atividades são arbitrariamente definidas como unidade para líquidos e sólidos puros, gases a 1 atm e compostos em solução em concentração aproximadamente 1 M. Segue-se, por anto, que ΔG° é uma constante para uma dada reação.

Deve-se ter em mente que é o valor de ΔG e não o de ΔG° que indicará se uma reação é espontânea ou não. Em relanto, as tabelas que se encontram nos textos sempre incluem os valores de ΔG°, porque são quantidades definidas, enquanto que ΔG pode ter qualquer valor, dependendo das condições aplicadas na Eq. (8.17) que obviamente reflete-se na Eq. (8.18).

Quando uma reação atinge o equilíbrio, $\Delta G = 0$. Nesse ponto, a energia livre é mínima e não há possibilidade de posteriores transformações. Obtém-se então

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \tag{8.19}$$

ou então,

$$\Delta G^\circ = -2{,}303RT \log K \tag{8.20}$$

Na realidade, os valores de ΔG° são aditivos, ou seja, a variação-padrão de energia livre de uma reação é a diferença entre a energia-padrão dos reagentes e a energia-padrão dos produtos.

$$\text{a)}\quad L + M \leftrightarrow N + O \qquad (\Delta G^\circ = -8000\,\text{cal/mol})$$

$$\text{b)}\quad N + O \leftrightarrow P + Q \qquad (\Delta G^\circ = +6000\,\text{cal/mol})$$

$$\text{Então:}\quad L + M \leftrightarrow P + Q \qquad (\Delta G^\circ = -2000\,\text{cal/mol})$$

Quando as medidas de variação de energia livre de uma reação são feitas em outras temperaturas que não 25°C, o valor de ΔG° deve ser seguido da indicação da temperatura. Da mesma forma, o valor de ΔG° é modificado quando as reações envolvem diferentes valores pH. A variação-padrão de energia livre a pH 7,0 é designada como $\Delta G^{\circ\prime}$.

A Eq. (8.20) possibilita o cálculo de ΔG° de qualquer reação, a uma dada temperatura, a partir de sua constante de equilíbrio, a qual é determinada por métodos analíticos. Se $K_{eq} = 1,0$, então $\Delta G^\circ = 0,0$ e não ocorre qualquer variação na energia livre quando 1 mol dos reagentes é completamente convertido nos produtos, sendo que todos os componentes estão na concentração 1,0 M. Se K_{eq} for maior do que 1,0, então ΔG° será negativo. Se K_{eq} for menor do que 1,0, ΔG° será positivo. Tem-se assim as reações exergônicas e endergônicas, respectivamente. A Tab. 1 mostra uma relação entre os valores de ΔG° e a grandeza da constante de equilíbrio.

Tabela 8.1 Relação entre os valores de ΔG° e a constante de eq. K_{eq} a 25°C

ΔG° (cal)	K_{eq}
-4089	1.000
+2716	[illegible]
+1363	0,1
[illegible]	[illegible]
+363	[illegible]
2716	[illegible]
4089	000

Os valores da Tab. 8.1 foram obtidos com dados de que em uma dada reação o equilíbrio é atingido, porém reagentes e produtos são mantidos dentro de estreitos limites em [illegible] de [illegible] [illegible] [illegible] podem ser

bastante diferentes dos níveis de equilíbrio. Entretanto, a energia liberada ou utilizada em uma reação depende da magnitude com que o sistema se desvia do equilíbrio. Na realidade, uma expressão matemática de ΔG de uma reação deve, então, conter dois termos, um indicando as concentrações atuais dos reagentes e produtos e outro indicando as concentrações no equilíbrio. Assim, para a reação

$$aA + bB \leftrightarrow cC + dD$$

temos

$$\Delta G = -RT \ln K' + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \qquad (8.21)$$

$$\Delta G = -2{,}3RT \log K' + 2{,}3RT \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \qquad (8.22)$$

que, a 25°C, nos leva a

$$\Delta G = -1363 \log K' + 1363 \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \qquad (8.23)$$

No equilíbrio, a relação entre a concentração dos produtos e a dos reagentes é igual a K' e, portanto, $\Delta G = 0$.

Logo:

$$\Delta G^\circ = -1363 \log K' \qquad (8.24)$$

Desse modo, o valor de ΔG° está relacionado com K'.

A Tab. 8.2 mostra uma relação de valores de ΔG° de algumas reações de importância biológica, calculados a partir de medidas de equilíbrio e dos valores de energia livre de formação. O ΔG° de uma reação química é igual à diferença entre a soma das energias livres-padrão de formação dos produtos e a soma das dos reagentes, levando-se em conta a estequiometria da reação. Observe-se que, na Tab. 8.2, estão indicados dois tipos de reações, que se dão com decréscimo especialmente grande na energia livre de hidrólise: a hidrólise de anidridos (anidrido acético, por exemplo) e reações de oxidação. Essas reações são de grande significado bioquímico nas transformações de energia na célula.

Tabela 8.2 Valores da variação de energia livre-padrão de algumas reações que ocorrem

REAÇÃO	$\Delta G'^{\circ}$ kcal em pH 7,0 e 25°C
Oxidação	
glicose + $6O_2$ → $6CO_2$ + $6H_2O$	686
Palmitato + $23O_2$ → $16CO_2$ + $16H_2O$	−2338
Hidrólise	
anidrido acético + H_2O → 2 acetato	2,8
pirofosfato + H_2O → 2 fosfato	8,0
glicose-6-fosfato + H_2O → glicose + fosfato	3,3
glutamina + H_2O → glutamato + NH_4	3,4
sacarose + H_2O → glicose + frutose	7,0
Reagrupamento	
glicose-1-fosfato → glicose-6-fosfato	+1,7
frutose-6-fosfato → glicose-6-fosfato	−0,4
Eliminação	
malato → fumarato + H_2O	+0,75

8.2.7 – Potencial de oxirredução

Oxidação é a perda de elétrons e redução é o ganho de elétrons, sendo ambos os processos complementares. Um sistema de oxirredução (OR) típico pode ser escrito

$$\text{forma reduzida} \leftrightarrow \text{forma oxidada} + n\,e^-$$

onde n é o número de elétrons envolvidos na reação. Se um eletrodo de metal inerte (platina ou prata) é imerso em uma solução de um sistema OR, estabelece-se uma diferença de potencial entre os elétrons na solução e os no metal. Essa condição dá nascimento a um potencial de eletrodo (E), cujo valor é assim calculado

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}$$

E é a constante específica para um dado sistema conhecida como potencial de eletrodo padrão, ou tem para o R a constante dos gases = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹, T a temperatura absoluta e n o número de equivalentes envolvidos na reação. Para o n = 96 494 C necessário para se obter equivalente de um elemento em seqüência de uns e os cátions são concentrações das formas oxidada e reduzida do sistema *OR*.

Um eletrodo nu se encontra na situação de um sistema de fronteira que se comporta como semipermeável, de diferença de potencial é impossível medir, a que eletrodo não retira simplesmente para medida de se combinar com outra semicélula formando uma pilha completa. A diferença de potencial entre ambas as semicélulas é medida conectando-as por meio de um potenciômetro. Para se determinar o potencial de eletrodo de um composto usa-se o eletrodo de hidrogênio como padrão de referência, que é arbitrariamente tomado como zero. Porém não há necessidade de se fazer uso do eletrodo de hidrogênio em cada medida, basta que se use um eletrodo de construção mais fácil, como o de calomelano, cujo potencial é acuradamente determinado em relação à semicélula de hidrogênio. Consequentemente surge um novo termo, E_h, onde E_h é o potencial do eletrodo de comparação que pode ser de calomelano ou eletrodo de hidrogênio.

$$E_h = E - E_{h_2}$$

onde E_{h_2} é o potencial do eletrodo de hidrogênio, que por definição é zero. Assim a equação geral para o cálculo do potencial de um sistema *OR* é:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}$$

Quando E_h aumenta, o sistema será mais positivo, seja proporção [illegible] aumentar e, [illegible] será mais negativo, a menos que [illegible] seja o mais reduzido, [illegible] oxidada. Quando [illegible] $E_h = E$. Conhecendo-se o valor de E pode-se [illegible] o potencial de eletrodo [illegible] sistema em qualquer grau de oxidação ou redução. Por outro lado, o grau de oxidação pode ser obtido medindo-se o potencial de eletrodo.

No Tópico 8.3 é [illegible] exemplo [illegible] vários sistemas [illegible] biológicos. Qualquer sistema será capaz de ser oxidado por um sistema mais positivo, isto é, [illegible] e por sua vez oxidará qualquer sistema mais negativo, que pode portanto ser [illegible]. Nesse caso, [illegible] que para [illegible] pode ser necessário a fim de determinar a ação entre ambos os sistemas, [illegible] uma reação enzimática [illegible] um substrato. O resultado [illegible] menor quantidade de energia [illegible] ou seja, [illegible] sem [illegible] a [illegible] na energia de ativação deste último.

Note-se que E° refere-se a medidas feitas no valor pH zero, o que frequentemente é impossível. Usa-se o termo E' para indicar que o potencial de eletrodo-padrão foi estabelecido a um dado valor do pH.

8.2.8 Energia livre das reações de oxirredução

Consideremos uma mistura de dois diferentes sistemas OR no mesmo pH, porém com potenciais diferentes. Em ambos ocorreria uma reação, a qual, em um dado momento, atingiria o equilíbrio, ou seja, os dois sistemas alcançaram o mesmo potencial. Como exemplo, tomemos o caso do sistema desidrogenase succínica-azul-de-metileno, processando-se a reação, por exemplo, no tubo de Thumberg

$$\begin{array}{ccc} \text{succinato} & \leftrightarrow & \text{fumarato} + H_2 \\ AM + H_2 & \leftrightarrow & AMH_2 \\ \hline \text{succinato} + AM & \leftrightarrow & \text{fumarato} + AMH \end{array} \qquad (8.25)$$

sendo AM azul-de-metileno e AMH_2 azul-de-metileno reduzido (leucobase). A constante de equilíbrio será

$$K = \frac{[\text{fumarato}]\,[AMH_2]}{[\text{succinato}]\,[AM]}$$

Quando as soluções são misturadas, o sistema succinato-fumarato tem um potencial mais baixo, reduz o sistema azul-de-metileno e se oxida. Consequentemente, a relação fumarato/succinato aumenta e a relação AM/AMH_2 diminui, determinando um aumento no potencial do primeiro sistema e um decréscimo no potencial do último, até que o equilíbrio é alcançado, quando então ambos os sistemas terão o mesmo potencial ($E_{h1} = E_{h2}$). A temperatura é de 30°C e n = 2.

$$E_{o\,(\text{fum-suc})} + 0{,}03.\log\frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]} = E_{o\,(AM-AMH_2)} + 0{,}03.\log\frac{AM}{[AMH_2]}$$

$$\Delta E'_o = 0{,}011 - 0{,}005 = 0{,}03.\log\frac{[\text{fumarato}]\,[AMH_2]}{[\text{succinato}]\,[AM]},$$

$$0{,}006 = 0{,}03.\log\frac{[\text{fumarato}]\,[AMH_2]}{[\text{succinato}]\,[AM]}$$

Tabela 8.1 Potenciais de oxirredução de algumas reações bioquímicas*

REAÇÃO escrita na forma de redução	E' pH 7,0 (V)
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	+ 0,816
$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	+ 0,771
$\frac{1}{2}O_2 + H_2O + 2e^- \rightarrow H_2O_2$	+ 0,30
citocromo a $Fe^{3+} + 1e^- \rightarrow$ citocromo a Fe^{2+}	+ 0,29
citocromo c $Fe^{3+} + 1e^- \rightarrow$ citocromo c Fe^{2+}	+ 0,25
crotonil CoA + 2H⁺ + 2e⁻ → butiril CoA	+ 0,19
ubiquinona + 2H⁺ + 2e⁻ → ubiquinona H_2	+ 0,10
fumarato + 2H⁺ + 2e⁻ → succinato	+ 0,030
FAD + 2H⁺ + 2e⁻ → $FADH_2$	0,00
oxaloacetato + 2H⁺ + 2e⁻ → malato	− 0,02
α-cetoglutarato + NH_4^+ + 2H⁺ + 2e⁻ → glutamato + H_2O	− 0,14
acetaldeído + 2H⁺ + 2e⁻ → etanol	− 0,163
piruvato + 2H⁺ + 2e⁻ ⟶ lactato	− 0,190
$NAD^+ + 2H^+ + 2e^-$ → NADH + H⁺	− 0,320
$NADP^+ + 2H^+ + 2e^-$ → $NADPH + H^+$	− 0,320
piruvato + CO_2 + 2H⁺ + 2e⁻ ⟶ malato	− 0,33
acetil CoA + 2H⁺ + 2e⁻ → acetaldeído + CoA	− 0,41
$CO_2 + 2H^+ + 2e^-$ → formiato	− 0,420
$H^+ + 1e^-$ ⟶ $\frac{1}{2}H_2$	− 0,420
ferredoxina $Fe^{+3} + 1e^-$ → ferredoxina Fe^{+2}	− 0,432
acetato + 2H⁺ + 2e⁻ → acetaldeído	− 0,60
acetato + CO_2 + 2H⁺ + 2e⁻ → piruvato	− 0,70

* Atividade unitária de todos os componentes, exceto H⁺ que é mantido em concentração 10^{-7} M. Os gases, a 1 atm de pressão.

Como as concentrações iniciais dos quatro componentes foram iguais, temos

$$0{,}006 = 2 \cdot 0{,}03 \cdot \log \frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]}$$

$$\log \frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]} = 0{,}10$$

e então:

$$\frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]} = \frac{[AM]}{[AMH_2]} = 1{,}26$$

Fazendo-se x = % de AMH_2, temos

$$\frac{x}{100 - x} = 1{,}26$$

$$x = 55{,}8\%$$

Logo, no equilíbrio, 55,8% do corante estarão na forma reduzida. No caso discutido, temos

$$\Delta E'_0 = \frac{RT}{nF} \ln K'$$

de onde se segue que

$$nF \cdot \Delta E'_0 = RT \ln K' \qquad (8.26)$$

Ora, a partir dos conceitos de Termodinâmica, sabe-se que $\Delta G°$ está relacionada com K

$$\Delta G° = -RT \ln K \qquad (8.27)$$

Segue-se portanto, que

$$\Delta G° = nF \cdot \Delta E_0 \qquad (8.28)$$

Isso significa que a variação-padrão de energia livre de uma reação entre dois sistemas *OR* pode ser calculada a partir da diferença entre os valores ΔE°. De maneira semelhante, pode-se calcular a variação de energia livre para sistemas individuais e, desses dados, calcular-se a variação na energia livre dos sistemas combinados:

$$\Delta G^\circ = \Delta G_1^\circ - \Delta G_2^\circ$$

Na Eq. (8.28), o valor de ΔE° deve ser positivo, a fim de se obter ΔG negativo, ou seja, um valor ΔE° positivo indica uma reação espontânea.

O potencial de redução de uma meia-reação, na qual as formas oxidada e reduzida da substância estão presentes em concentrações não-padrão, pode ser calculado a partir da equação de Nernst:

$$E = E^\circ + \frac{2{,}3RT}{nF} \log \frac{[\text{oxidada}]}{[\text{reduzida}]}$$

A 30°C, o termo $2{,}3RT/F = 0{,}06$ V e, portanto,

$$E = E^\circ + \frac{0{,}06}{n} \log \frac{[\text{oxidada}]}{[\text{reduzida}]}$$

8.3 Os níveis de energia livre

Em 1927, Eggleton & Eggleton e, pouco depois, Fiske & Subbarow isolaram creatina do músculo; essa substância se apresenta fosforilada e, tal como a do ácido arginínico que também se encontra nos músculos, tem uma elevada energia de hidrólise (Fig. 8.2). Isso significa que, quando a ligação fosfatada se rompe, liberta energia livre de alto nível que é utilizada para o processo de contração muscular.

Lundsgaard, em 1930, observou que o músculo envenenado por iodoacetato ainda era capaz de contração. O tipo de inibição por iodoacetato já fora estudado. Ainda mais, nessas mesmas condições, o rastro de creatina desaparecia no início. Deveria haver, portanto, uma outra fonte de energia capaz de realizar aquela ação. Supôs-se que essa fonte fosse o trifosfato de adenosina (ATP), que já havia sido isolado de músculo, por Lohmann, em 1929. Nos anos subsequentes elucidou-se sua estrutura e o ATP mostrou-se ser um composto rico de energia existente em células de animais, plantas e microrganismos, com a função de armazenar a energia advinda das reações exergônicas (Fig. 8.3). A energia livre produzida na hidrólise de suas ligações fosfatadas é utilizada nos processos endergônicos da célula.

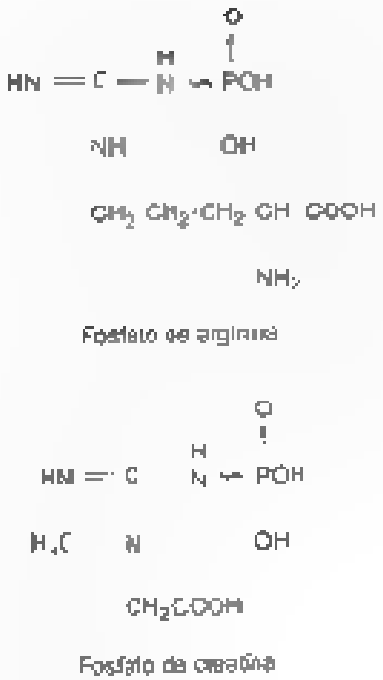


Figura 8.2 Fosfato de arginina e fosfato de creatina

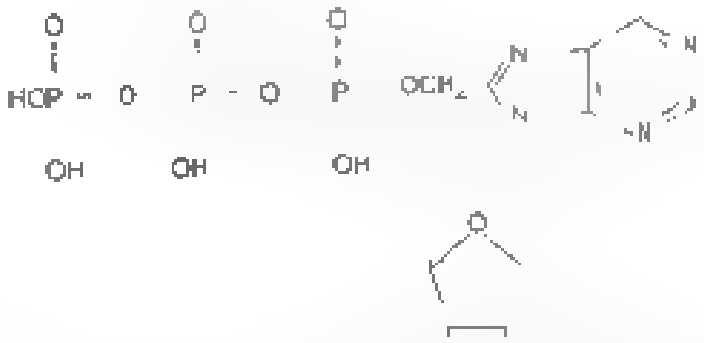


Figura 8.3 Estrutura da adenosina: ATP = adenosina 5' trifosfato; ADP = adenosina 5' difosfato; AMP = adenosina 5' monofosfato (ácido adenílico)

Apesar de ser tão importante, o ATP existe nos músculos em diminuta concentração, uma vez que ele é parte do reservatório de compostos ricos de energia, tais como os "fosfogênios", que são a fosfocreatina nos vertebrados e fosfoarginina nos invertebrados. A reação de formação de fosfogênio é a "reação de Lohman", pois foi Lohman quem demonstrou que essas substâncias estão em equilíbrio com ATP.

$$\text{creatina} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{fosfocreatina} \qquad (8.29)$$

O valor ΔG° dessa reação é pequeno, uma vez que K aproxima-se da unidade. Isso tem dois significados:

- a energia passa facilmente de ATP para a creatina;
- a reação se dá nos dois sentidos, dependendo da concentração dos reagentes.

Há outros compostos que, como o ATP, possuem também fósforo: são os fosfatos de uridina, de citidina e de guanosina. Esses compostos, por hidrólise de seus grupos fosfato, liberam energia livre. Se bem que ATP seja o reagente mais comum dentre os fosfonucleosídeos, UTP, CTP e GTP (Figs. 8.4, 8.5, 8.6) são também importantes respectivamente no metabolismo de açúcares, na biossíntese de lipídeos e na oxidação de ácido α-cetoglutárico.

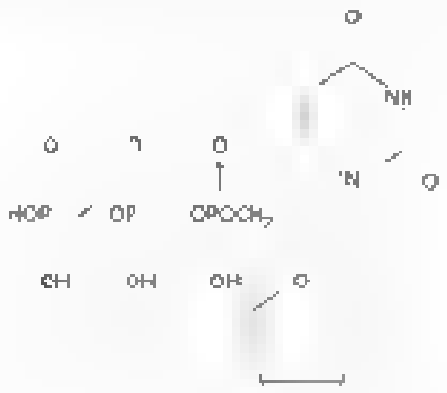


Figura 8.4 — Fosfatos de uridina. UTP = uridina 5'-trifosfato; UDP = uridina 5'-difosfato; UMP = uridina 5'-monofosfato, ácido nítrico.

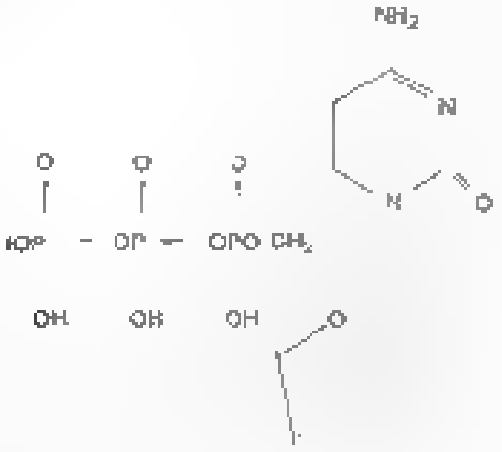


Figura 8.5 — Fosfatos de citidina e de guanosina. CTP = citidina 5'-trifosfato; CDP = citidina 5'-difosfato; CMP = citidina 5'-monofosfato, ácido cítrico.

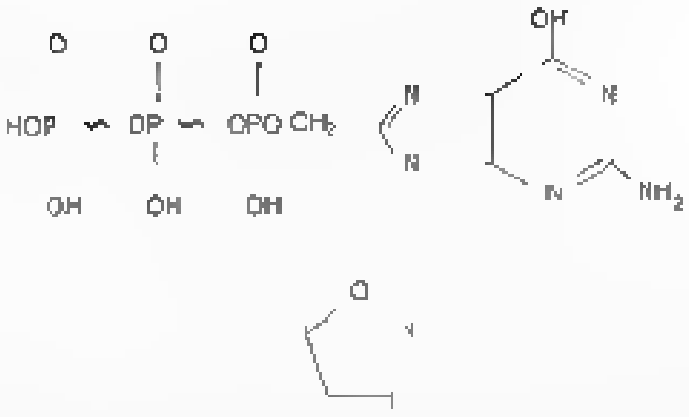


Figura 8.6 Fórmulas de guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-difosfato (GMP), guanosina-5'-monofosfato (ácido guanílico).

Note-se que, nas fórmulas estruturais indicadas, o sinal (~) indica ligação rica de energia. Essa ligação é também encontrada em outros compostos, fosfatados ou não. A Tab. 8.4 mostra os valores de energia livre-padrão de hidrólise de alguns compostos fosforilados.

Tabela 8.4 Energias livres-padrão de hidrólise de compostos fosforilados.

COMPOSTO	ΔG° (kcal)
Glicerol-1-fosfato	-2,20
Glicose-6-fosfato	-3,30
Frutose-6-fosfato	-3,80
Glicose-1-fosfato	-5,00
ATP[a]	-7,30
Fosfoarginina	-7,70
Acetilfosfato	-10,[illegible]
Fosfocreatina	-10,30
3-difosfoglicerato	-11,80
Fosfoenolpiruvato	-14,80

8.3 Energia livre de hidrólise do ATP

A medida da energia livre de hidrólise do ATP deveria ser realizada, em princípio, a partir da eq. (8.30), utilizando-se a Eq. (8.27).

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i \text{ (fosfato inorgânico)} \tag{8.30}$$

Entretanto, na prática, a medida direta da constante de equilíbrio dessa reação é dificultada, principalmente porque os métodos analíticos disponíveis não são suficientemente sensíveis para determinar o momento em que o equilíbrio foi atingido e, consequentemente, as concentrações de ATP, ADP e Pi nesse ponto. Isso se deve ao fato de que, no equilíbrio, quase todo o ATP é hidrolisado a ADP e Pi. Utilizamos, então, a natureza aditiva dos valores de ΔG° de reações consecutivas, medindo a energia livre de hidrólise do ATP a pH 7,0 a 37°C e na presença de excesso de Mg^{2+}, fazendo-o reagir com glicose na reação de hexoquinase. Nessa reação são produzidos ADP e glicose-6-fosfato.

$$\text{glicose} + ATP \xrightarrow{\text{hexoquinase}} \text{glicose-6-fosfato} + ADP \tag{8.31}$$

$$K' = 661,\ \Delta G^\circ = 4{,}00 \text{ kcal}$$

Em seguida, mede-se a constante de equilíbrio e o valor de ΔG° da hidrólise de glicose-6-fosfato, catalisada por fosfatase.

$$\text{glicose-6-fosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{fosfatase}} \text{glicose} + \text{fosfato} \tag{8.32}$$

$$(K = 171,\ \Delta G_2^\circ = 3{,}30 \text{ kcal})$$

Somando as Eqs. (8.31) e (8.32), tem-se a equação da hidrólise de ATP. Desde que os valores de ΔG° de ambas as reações são aditivos, pode-se calcular a energia livre-padrão de ATP.

$$\Delta G^\circ_{ATP} = \Delta G^\circ_1 + \Delta G^\circ_2 = -4{,}00 + (-3{,}30) = -7{,}30 \text{ kcal}$$

A reação é extremamente exergônica.

O grupo fosfato terminal de ADP também tem o mesmo nível de energia livre de hidrólise.

$$ADP + H_2O \longrightarrow AMP + P_i\ (\Delta G^\circ = -7{,}30 \text{ kcal}) \tag{8.33}$$

Por sua vez, o grupo fosfato de AMP tem baixa energia livre de hidrólise.

$$AMP + H_2O \longrightarrow \text{adenosina} + P_i\ (\Delta G^\circ = -3{,}40 \text{ kcal}) \tag{8.34}$$

Observe-se que as ligações entre os grupos fosfato são de anidrido, enquanto que a ligação entre fosfato e ribose é ligação de éster. Essa diferença parece estar nas propriedades tanto dos reagentes quanto dos produtos, pois a energia livre-padrão de hidrólise é uma medida da diferença entre as energias livres dos reagentes e dos produtos.

de moléculas e a dos compostos que são reservatório de ligações fosfatadas ricas de energia.

8.3.2 Compostos produzidos durante a degradação de moléculas

Na glicólise (ver Cap. 6), o fosfato do C_1 da molécula do ácido 1,3-difosfoglicérico é transferido para a molécula do ADP, formando-se ATP e ácido 3-fosfoglicérico em uma reação catalisada pela enzima fosfoglicerofosfoquinase. Conhecendo-se a constante de equilíbrio da reação de transferência de fosfato, calcula-se a energia livre-padrão de hidrólise do ácido 1,3-difosfoglicérico. Em pH 7,0 tem-se

$$\text{1,3-difosfoglicerato} + \text{ADP} \longrightarrow \text{3-fosfoglicerato} + \text{ATP} \qquad (8.35)$$

$$K = 2070;\ \Delta G^{o\prime} = -4{,}50\ \text{kcal}$$

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi} \quad (\Delta G^{o\prime} = -7{,}30\ \text{kcal})$$

Aplicando-se o princípio da adição para essa sequência de reações, a energia livre-padrão de hidrólise do grupo 1-fosfato do ácido será

$$\Delta G^{o\prime} = (-7{,}30 + -4{,}50) = -11{,}8\ \text{kcal}$$

8.3.2.2 Compostos que são reservatórios de ligações fosfatadas ricas de energia

São os fosfogênios, a discutir. A natureza rica de energia de fosfoarginina e fosfocreatina reside no fato de que os grupos guanidino e fosfato sofrem uma constrição em sua estabilização ressonante normal. Quando o grupo fosfato é hidrolisado, essa constrição diminui e os produtos de reação formam híbridos de ressonância estáveis.

8.3.3 Compostos de baixa energia livre de hidrólise

Quando ésteres fosfóricos de álcoois orgânicos sofrem hidrólise, o $\Delta G^{o\prime}$ livre, em pH 7,0, possui pouca ou nenhuma estabilidade ressonante. Existem enzimas, como a glicerofosfoquinase e a hexofosfoquinase, que catalisam a transferência de grupos fosfato de ATP para aceptores específicos para formar compostos de baixa energia livre de hidrólise.

$$\text{ATP} + \text{glicerol} \xrightarrow{\text{glicerofosfoquinase}} \text{ADP} + \text{glicerol-3-fosfato} \qquad (8.36)$$

$$\Delta G^{o\prime} = -5{,}10\ \text{kcal}$$

$$\text{ATP} + \text{glicose} \xrightarrow{\text{hexofosfoquinase}} \text{ADP} + \text{glicose-6-fosfato} \qquad (8.37)$$

$$(\Delta G^{o\prime} = -4{,}00\ \text{kcal})$$

Devido ao fato de os valores de $\Delta G^{o\prime}$ dessas reações serem menos negativos do que para a hidrólise de ATP, ambas as reações tendem para a direita.

8.4 Transferência enzimática de grupos fosfato

O mecanismo pelo qual uma reação exergônica dirige um processo endergônico pode ser exemplificado pela síntese de um éster e a hidrólise simultânea de ATP em AMP + PPi:

a) $R\text{-}COOH + HO\text{-}R' \leftrightarrow R\text{-}COOR' + H_2O$ $\Delta G^{o\prime} = +4000$ cal

b) $ATP + H_2O \leftrightarrow AMP + PPi$ ($\Delta G^{o\prime} = -6000$ cal)

Soma $RCOOH + HO\text{-}R' + ATP \rightarrow RCOOR' + AMP + PPi$ ($\Delta G^{o\prime} = -2000$ cal)

No caso presente, a reação (b) somente guia a reação (a) se for conjugada a um intermediário comum, como no seguinte caso hipotético:

c) $R\text{-}COOH + ATP \leftrightarrow R\text{-}COO\text{-}AMP + PPi$ ($\Delta G^{o\prime} = 0$)

d) $R\text{-}COO\text{-}AMP + HO\text{-}R' \leftrightarrow R\text{-}COOR' + AMP$ ($\Delta G^{o\prime} = -2000$ cal)

Soma $R\text{-}COOH + HO\text{-}R' + ATP \rightarrow RCOOR' + AMP + PPi$ $\Delta G^{o\prime} = -2000$ cal

PPi = pirofosfato inorgânico

O intermediário R-COO-AMP é um acil-adenilato (Fig. 8.7) e é um anidrido entre o ácido carboxílico e o fosfato do ácido adenílico.

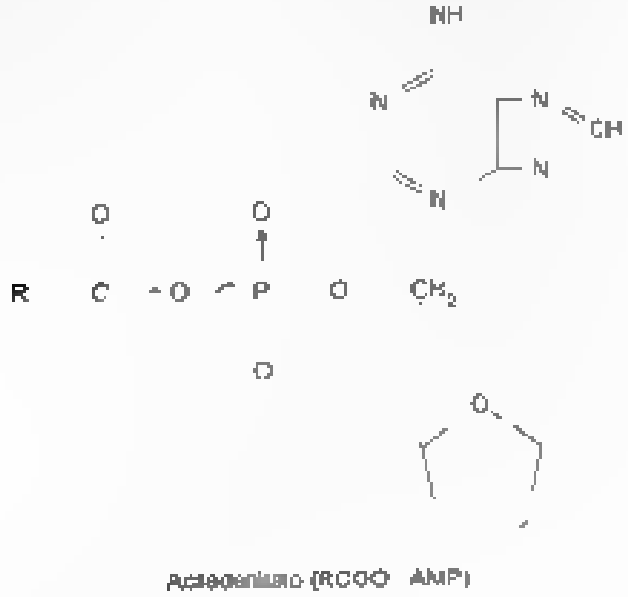


Figura 8.7 Acil-adenilato (RCOO-AMP)

Na formação de um acil-adenilato, rompe-se a ligação entre o pirofosfato e a porção adenílica do ATP, sendo o produto final um pirofosfato e não um ortofosfato. O valor $\Delta G^{o'}$ dessa ligação é algo menor do que o valor da primeira ligação do ATP. Devido à pequena variação no valor da energia livre, a síntese de um éster orgânico através desse mecanismo não é muito favorecida. Os usos metabólicos do pirofosfato parecem não ser muitos. Há, entretanto, pirofosfatases que catalisam a hidrólise de pirofosfatos, produzindo ortofosfato, com $\Delta G^{o'} = -7.000$ cal. Por conseguinte, a hidrólise do pirofosfato formado durante a síntese de um éster torna essa síntese irreversível. Casos deste tipo envolvem a síntese de nucleotídeos, polinucleotídeos e ligações de peptídeos e a ativação de ácidos graxos.

8.3.4.1 – Quinases

As quinases são enzimas que catalisam a transferência de fosfato do ATP para um aceptor. São divididas em duas grandes categorias, conforme segue:

a) Quinases que catalisam transferências entre compostos cujo $\Delta G^{o'}$ para a hidrólise de cada um deles é da mesma grandeza. A transferência, portanto, pode-se dar em ambos os sentidos:

$$\text{ADP} + \text{fosfocreatina} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{creatina} \qquad \Delta G^{o'} = -1500 \text{ cal}, K' = 10$$

b) Quinases que catalisam transferência com formação de compostos de baixa energia de hidrólise. A reação, com toda probabilidade, é irreversível:

$$\text{ATP} + \text{glicose} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{glicose-6-fosfato} \qquad \Delta G^{o'} = -4500 \text{ cal}, K = 4000$$

De acordo com Lipmann, a importância da formação de ésteres fosfóricos reside no fato de o fosfato conferir estabilidade cinética a moléculas termodinamicamente lábeis. Assim, quanto maior a estabilidade em água de um éster fosfórico, maior será a sua utilidade bioquímica. Apesar de o $\Delta G^{o'}$ de hidrólise de anidrido acético, acetilfosfato e pirofosfato inorgânico ser da mesma grandeza para os três, a estabilidade dos mesmos é de poucos segundos, algumas horas e alguns anos, respectivamente. O ATP é estável em água, o que é de considerável vantagem para a economia da célula.

O sistema ATP/ADP é a ligação obrigatória que atua como uma ponte entre os compostos fosfatados ricos de energia livre com os de baixa energia. Fosfotransferases específicas atuam nessa transferência, como é o caso da quinase pirúvica (eq. 8.38):

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} \rightarrow \text{piruvato} + \text{ATP} \qquad (8.38)$$

O ATP formado nessa reação passa a ser um doador de grupo fosfato em uma outra reação enzimática, formando um composto de baixa energia.

$$\text{ATP} + \text{glicose} \xrightarrow{\text{hexoquinase}} \text{ADP} + \text{glicose-6-fosfato} \qquad (8.39)$$

O resultado é a transferência de um grupo fosfato de um doador de alto nível para um aceptor de baixo nível de energia, produzindo a seguinte reação total

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{glicose} \rightarrow \text{piruvato} + \text{glicose-6-fosfato} \qquad (8.40)$$

Desse modo, o conteúdo de energia da molécula de glicose foi elevado ao mesmo nível dos resíduos glicosídicos do glicogênio.

Como indica a Fig. 8.8, na cadeia de reações que transfere energia na célula o grupo fosfato nunca é transferido diretamente de um conjunto de alto nível para um aceptor de baixo nível. Não se conhecem enzimas que catalisem essas transferências diretas. Do mesmo modo, não existem nas células enzimas que transferem grupos fosfato de um doador rico de energia como, por exemplo, ácido 1,3-difosfoglicérico, para outro aceptor também rico de energia como o piruvato, ou ainda, de um doador de baixo nível, como o glicerol 3-fosfato, para um aceptor também de baixo nível, como a glicose. É que todas as reações de transferência de fosfato que ocorrem na célula devem ser realizadas através do sistema ATP/ADP.

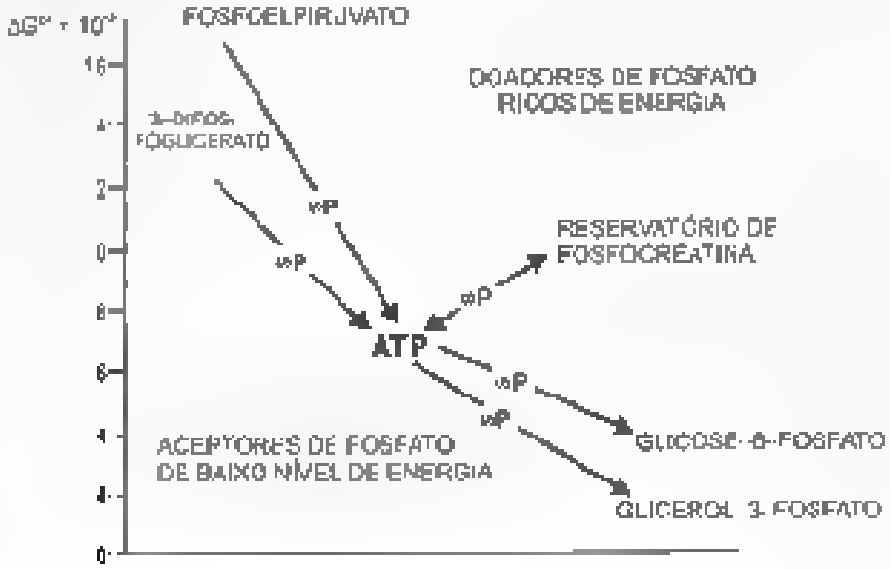


Figura 8.8 Fluxo de grupos fosfato (~P)

8.3.5 — Acoplamento de reações

As vezes uma reação endergônica, que não se processa por si mesma devido a um aumento na energia livre, pode ser acoplada com uma reação exer-

[illegible] e assim o sistema não se processará. Para que isso não ocorra, deve haver um intermediário comum a ambas as reações. Assim

$$A + B \rightarrow C + D \qquad [\Delta G_1^\circ = +(\text{endergônica})] \qquad (8.41)$$

$$D + \rightarrow M + N \qquad [\Delta G_2^\circ = -(\text{exergônica})] \qquad (8.42)$$

$$A + B + \rightarrow C + M + N \qquad [\Delta G_3^\circ = -(\text{endergônica})] \qquad (8.43)$$

[illegible] formado [illegible] um reagente para a reação seguinte [illegible] 8.42 e [illegible] se [illegible] a partir de [illegible] 8.41 e 8.42 [illegible] 8.43. Isso pode ser considerado como um exemplo do princípio de [illegible] segundo o qual uma reação pode complementar-se pela [illegible] de outra [illegible] pois o [illegible] é dado e que [illegible] pelo seu [illegible] com uma segunda reação.

Nem sempre uma reação espontânea necessariamente ocorre. Assim a oxidação da glicose [illegible] é uma reação com ΔG negativo mas se efetua pela simples exposição da glicose à [illegible] atmosférico. Pelo contrário, é preciso que ambas as moléculas reagentes se choquem com energia suficiente para que haja interação entre suas estruturas [illegible]. Para tanto essa reação [illegible] toda reação exergônica somente ocorrerá se os reagentes [illegible] um excesso de energia para romper sua estabilidade. Esse excesso de energia para que uma reação tenha [illegible] é denominado [illegible] de ativação. Na fig. 8.4 pode-se notar que a molécula se encontra em um [illegible] energético estável. Ao receber a energia de ativação a [illegible] passa a um estado energético mais elevado, a partir do qual a reação é espontânea. Para [illegible] liberam-se [illegible] a energia [illegible] energia de ativação [illegible] pois, apesar de ser [illegible] para que a reação tenha [illegible] ocorra, é [illegible] no final da reação.

A hidrólise da ureia pode ser realizada tanto pela ação de um ácido como catalisada enzimaticamente através da urease. Na presença dessa enzima a energia de ativação necessária é significativamente reduzida.

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \xrightarrow{H^+} CO_2 + 2NH_3$$

$$E_a = 34\ \text{kcal/mol}$$

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \xrightarrow{\text{urease}} CO_2 + 2NH$$

$$E_a = 6{,}8\ \text{kcal/mol}$$

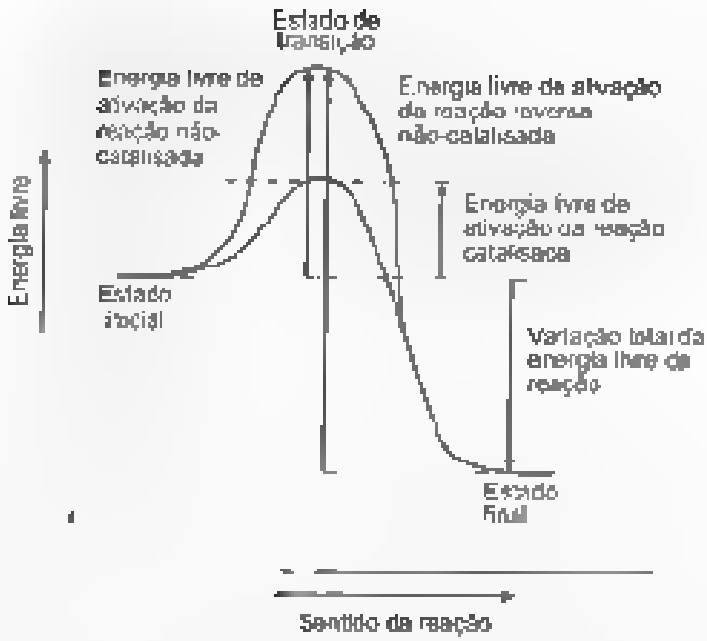


Figura 8.9 Ação da enzima no decréscimo do valor da energia de ativação de uma reação bioquímica

A necessidade de energia de ativação pode ser explicada pela distribuição estatística de Maxwell-Boltzmann, quando se diz que uma população de moléculas está em um nível de energia, quer-se dizer que a maioria das moléculas está nesse nível e que, portanto, algumas estarão em um nível energético mais elevado e outras em um mais baixo. As primeiras podem ter energia suficiente para ultrapassar a barreira energética e reagir. Na reação liberam energia que será utilizada para ativar outras moléculas. É quando então libera-se energia sem que necessário se torne introduzir energia externa ao sistema. Há contudo outras reações exergônicas que não se processam, uma vez que as moléculas mais energéticas não têm suficiente energia para reagir na temperatura em que o sistema se encontra. É o que acontece com a glicose que necessita de energia calórica para reagir. O que se observa é que com um ligeiro aquecimento há um grande aumento na velocidade da reação devido ao fato de que um maior número de moléculas passa a ter energia superior à de ativação.

Quase todas as reações metabólicas se processam através da mediação de um intermediário comum. Quando a energia é transferida em reações consecutivas via ATP, a energia química é transferida de um doador de alto nível energético para o ADP, e é conservada como ATP, que é um dos produtos da reação. Na reação subsequente, o ATP passa a atuar como substrato, transferindo seu grupo fosfato terminal para um aceptor, o qual aumenta seu conteúdo energético. Entretanto, muitas reações consecutivas não requerem grupos fosfato ou o ATP como intermediários comuns. Outros grupos funcionais são

também enzimaticamente transferidos, como amino, acil, átomos de hidrogênio e outros, em reações cujo tratamento termodinâmico é o mesmo que até agora estudamos para a transferência de grupos fosfato.

Ainda no caso específico da transferência de grupos fosfato, além do sistema ATP/ADP, os 5'-di- e -trifosfatos de outros ribonucleosídeos e 2-desoxirribonucleosídeos também participam nas transferências de energia na célula. Esses compostos fosforilados não servem só como precursores de ácidos nucléicos, mas atuam nas ações de reações que transferem energia química. Essa transferência, contudo, é feita através de reações catalisadas com o ATP através da mediação da enzima difosfoquinase de nucleosídeo, encontrada nas mitocôndrias e no citoplasma solúvel das células. As reações por ela catalisadas são reversíveis, e são relativamente não-específicas em relação ao substrato. Há transferência de fosfato de qualquer XTP para qualquer XDP. Sua $K_{eq} = 1,0$ em pH 7,0 independe da natureza dos reagentes, uma vez que a energia $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólise do grupo fosfato terminal de todos os 5'-trifosfatos é aproximadamente a mesma. A Fig. 8.10 mostra como os grupos fosfato ricos de energia entram nas várias vias de biossíntese através dos 5'-trifosfatos.

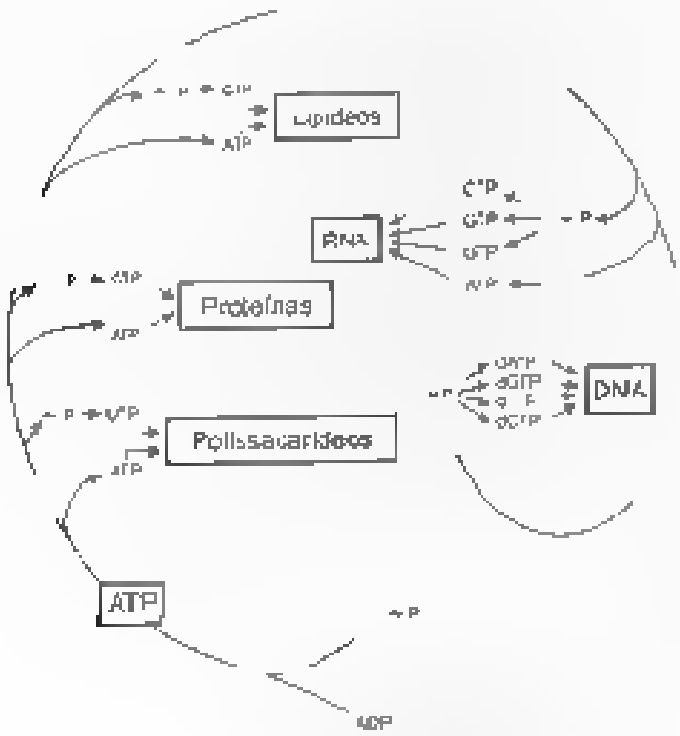


Figura 8.10 Nucleosídeos-trifosfatos como transportadores de grupos fosfato ricos de energia.

8.4 – Energética dos sistemas abertos

A análise dos sistemas fechados é relativamente simples, porque são considerados somente os estados inicial e final de um sistema após alcançar o equilíbrio. É o caso das reações enzimáticas individuais. Entretanto, quando se tenta aplicar esses conhecimentos às células intactas, as dificuldades tornam-se grandes, pois as células vivas são *sistemas abertos*, como a seguir e as trocam matéria com seu meio e, além disso, nunca estão totalmente em equilíbrio. Ou seja, em nenhum momento uma célula viva está em regime estacionário, no qual a intensidade de entrada de matéria é igual à intensidade de saída de matéria.

Os sistemas abertos em não-equilíbrio são estudados através da *termodinâmica dos processos irreversíveis ou do não-equilíbrio*, que não discutiremos aqui. Devemos lembrar, entretanto, que um sistema aberto em regime estacionário é capaz de produzir trabalho, justamente porque está longe do equilíbrio. Já sabemos que sistemas no ponto de equilíbrio são incapazes de produzir trabalho. E, por estarem longe do equilíbrio, os sistemas abertos podem ser controlados e regulados. Além disso, como bem lembra Schringer, "no formalismo da Termodinâmica do não-equilíbrio, a condição de regime estacionário, que é característica de toda máquina que está funcionando bem, pode ser considerada como o *estado ordenado* de um sistema aberto, ou seja, o estado no qual há um mínimo de produção de entropia". Ainda mais, todo o processo de biossíntese de macromoléculas e do desenvolvimento celular é uma poderosa força antientrópica. Como ressalta Katchalsky, "desde que não se pode escapar do *destino entrópico* de todos os fenômenos, os organismos vivos, mantendo um regime estacionário, produzem entropia com um mínimo de intensidade".

Literatura recomendada

BRAY, H.G. & WHITE, K. **Cinética y termodinámica en bioquímica.** Zaragoza: Ed. Acribia, 1958.

DAWES, E.A. **Quantitative problems in Biochemistry.** Edimburgo, E.S. Livingstone Ltd., 1966.

NIGRAHAM, L.C. & PARDEE, A.B. Free energy and entropy in metabolism. In: Metabolic Pathways. Greenberg, D.M. ed., 3.ed., p.2-45. Nova York: Academic Press, 1967.

KAPLAN, N.O. & KENNEDY, E.P. **Currents aspects of biochemical energetics.** Nova York: Academic Press, 1966.

BLOTZ. Energy changes in biochemical reactions. New York. Academic Press, 1967.

KREBS, H. A. & KORNBERG, H. L. Energy transformations in living matter. Berlin Spring-Verlag OHG, 1957.

LEHNINGER, A. The mitochondrion. New York. W. A. Benjamin, 1964.

LEHNINGER, A. Bioenergetics. New York. W. A. Benjamin, Inc., 1965.

LEHNINGER, A. Principles of Biochemistry. New York. Worth Publis. Inc., 1982.

LIPMANN, F. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. Advances in Enzymology. v. 1, 99p., 94.

MORRIS, G. A biologist's physical chemistry. Londres. Edward Arnold (Publs. Ltd., 1968.

PIMENTEL, G.C. & SPRATLEY, R.D. Understanding chemical thermodynamics. San Francisco. Holden-Day, Inc., 1969.

RACKER, E. Mechanisms in bioenergetics. New York. Academic Press, 1965.

SELLS, P. Biochemical calculations. New York. John Wiley & Sons, Inc., 1968.

9 PROCESSO BIOTECNOLÓGICO INDUSTRIAL GENÉRICO

Walter Borzani

Uma vez completado o exame de *fundamentos* indispensáveis ao estudo de problemas de *engenharia* (principal objetivo do Volume 2) e de aspectos de *tecnologia* (reunidos nos volumes 3 e 4) inerentes aos processos biotecnológicos industriais, parece-nos aconselhável apresentar aos alunos que estão se iniciando no campo da Biotecnologia Industrial uma representação esquemática de um processo biotecnológico industrial genérico, procurando destacar as principais etapas que o constituem.

O aluno poderá assim, quando do estudo de um tópico específico, situar a posição desse tópico no contexto geral do processo que esteja sendo examinado.

Em qualquer processo biotecnológico industrial o elemento central é o *reator*, pois nele se desenvolvem, devidamente controladas, as transformações que nos interessam.

Isso não quer dizer que o reator constitua a etapa mais importante do processo. Para que o resultado que se tem em vista seja alcançado, dois outros conjuntos de operações devem ser também cuidadosamente considerados, a saber:

1) Os *tratamentos iniciais* ("upstream processes"), que antecedem a operação no reator e cuja finalidade é colocar o sistema nas condições previamente escolhidas, para que as transformações, no reator, se desenvolvam a contento.

2) Os *tratamentos finais* ("Downstream processes"), que englobam a separação e a purificação dos produtos e subprodutos obtidos, bem como o tratamento dos resíduos formados.

A Fig. 9.1 representa esquematicamente, o que foi dito até este momento.

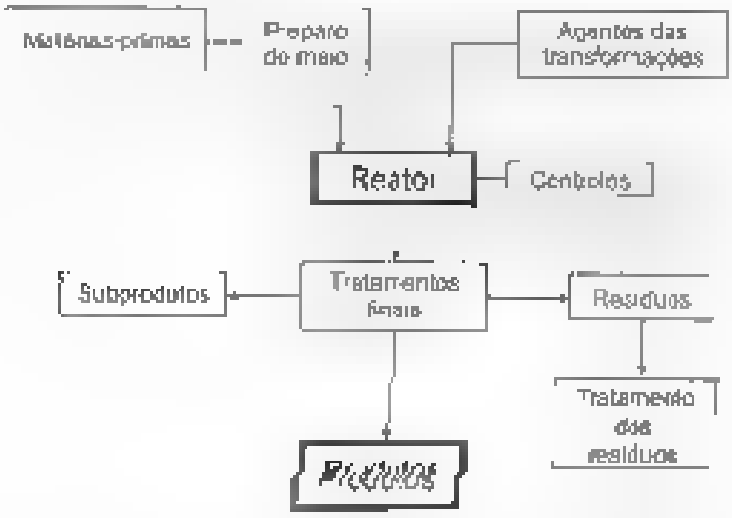


Figura 9.1 Representação esquemática de um processo biotecnológico industrial genérico.

Quando os agentes das transformações que ocorrem no reator são de uma enzima (purificada ou não), ou uma mistura de enzimas (também mais ou menos purificadas) ou ainda células inativadas ou mortas (que neste caso, funcionam como simples suportes das enzimas), o processo recebe a denominação genérica de *processo enzimático*.

Por outro lado, se os agentes das transformações são microrganismos vivos, de modo que as reações que se desenvolvem no reator são consequência da atividade vital das células microbianas, o processo é denominado *processo fermentativo*. Nesse caso, o reator é muito freqüentemente também chamado *fermentador* ou *dorna*.

Cumpre não esquecer que a atividade vital dos microrganismos responsáveis por um processo fermentativo é sempre o resultado de considerável número de reações enzimáticas. A rigor, portanto, quer nos processos chamados *enzimáticos*, quer nos denominados *fermentativos*, enzimas são, em última análise, os catalisadores das transformações que ocorrem no reator.

Dois casos importantes, que alguns autores engobam também na categoria de processos fermentativos, são aqueles em que os agentes das transformações são ou células de tecidos animais ou vegetais, ou vírus.

Em que pese o fato de a Fig. 9.1 poder representar, em suas linhas gerais, tanto processos enzimáticos quanto processos fermentativos, parece nos conveniente, com relação a estes últimos, apresentar mais pormenorizadamente as etapas que os constituem. É o que nos mostra a Fig. 9.2. Cumpre contudo informar que nem todos os processos fermentativos industriais com-

preendem *todas* as etapas indicadas na Fig. 9.2. Dependendo do processo considerado, uma ou mais dessas etapas podem não existir, como será visto no Volume 3 desta série Biotecnologia Industrial.

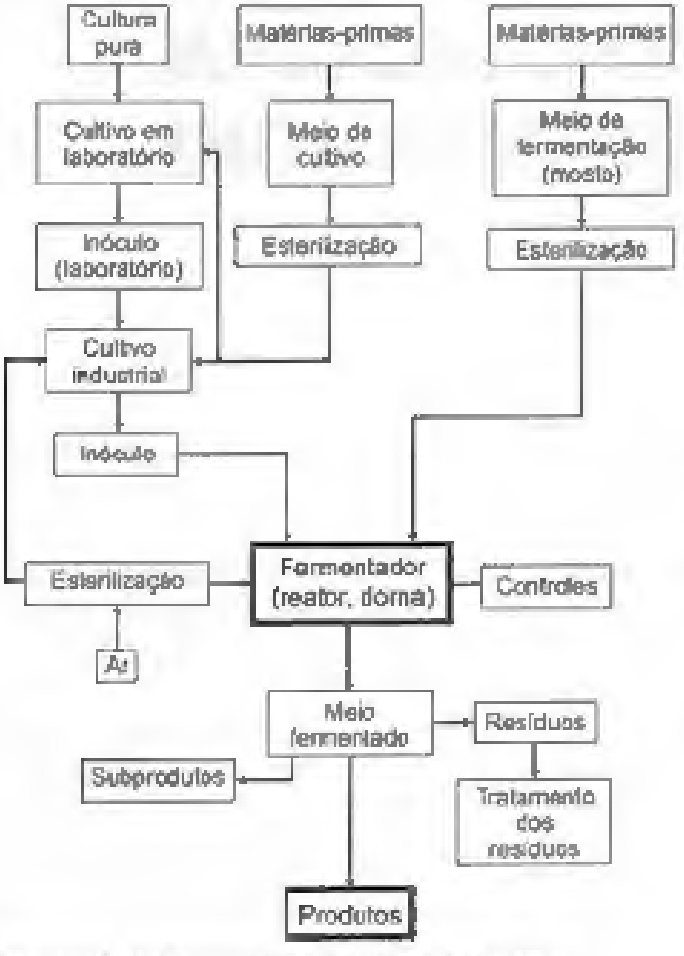


Figura 9.2 — Principais etapas de um processo fermentativo industrial genérico.

10 ALGUMAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Walter Borzani

Os dois últimos volumes desta Coleção tratam de examinar, com os pormenores cabíveis em cada caso, vários processos biotecnológicos de interesse industrial.

Parece-nos recomendável, contudo, a apresentação de uma enumeração sucinta de aplicações da Biotecnologia no setor industrial, para que o aluno possa, desde já, fazer uma idéia geral da importância da Biotecnologia Industrial em nossos dias.

Convém destacar, porém, que a relação de exemplos considerada neste capítulo não só não é completa, como também não pretende estabelecer qualquer ordem de importância relativa dos processos que serão apontados. Mesmo porque a dinâmica inerente aos complexos sistemas sócio-econômicos, tanto em nível regional como em nível mundial, pode fazer com que um dado processo, hoje pouco relevante em uma determinada região, passe a ser, às vezes a prazo relativamente curto, de fundamental importância nesta mesma região, e vice-versa.

Processos fermentativos são utilizados industrialmente na produção de bebidas alcoólicas (cervejas, vinhos, sidras, aguardentes), vinagres, etanol, ácidos orgânicos (cítrico, lático, fumárico, giberélico), solventes (butanol, acetona, isopropanol), vitaminas (riboflavina, ácido ascórbico, cobalaminas, ergosterol), antibióticos (penicilinas, estreptomicina, tetraciclinas, griseofulvin), polissacarídeos (dextrânios), aminoácidos (lisina, ácido glutâmico), esteróides modificados (por hidroxilação, hidrogenação, desidrogenação, hidrólise, esterificação, isomerização, amination, ruptura de cadeia lateral), leites fermentados (iogurte, leites acidófilos), manteigas, queijos, picles, chucrute, azeitonas, pão, cacau, lipídeos, ensilagem, várias proteínas. Metais diversos (cobre, zinco, prata, ouro, urânio) podem ser obtidos por fermentação, a partir de miné-

rios de baixo teor. Os processos de tratamento biológico de resíduos (águas residuárias, lixo) são, também, processos fermentativos. Não podem deixar de ser citados, para encerrar esta relação, os processos fermentativos que têm por objetivo a produção industrial de microrganismos que, por sua vez, podem ser utilizados:

1) Como agentes de outros processos fermentativos (leveduras para panificação, leveduras para produção de etanol, bactérias para tratamento biológico de efluentes);

2) Na alimentação do homem e de animais, quer na forma de concentrados protéico-vitamínicos (algas, leveduras do gênero *Candida*), quer no enriquecimento protéico, principalmente pela ação de bolores, de vários materiais (farinhas, farelos, resíduos da industrialização de frutas);

3) Como fixadores de nitrogênio do ar na agricultura (bactérias do gênero *Rhizobium*);

4) No controle biológico de pragas (bactérias do gênero *Bacillus*);

5) Na produção de vacinas (bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Mycobacterium*).

Quanto à utilização de enzimas, principalmente em meio aquoso, como agentes de transformações em escala industrial, cumpre ressaltar que sua importância vem crescendo acentuadamente. Citemos, sempre de maneira resumida, algumas indústrias em que são utilizados preparados enzimáticos para fins específicos: cervejaria (amilases, amiloglicosidase, papaína), panificação (amilases, pepsina, lipases), produção de edulcorantes (alfaamilase, invertase, glicose-isomerase), indústria têxtil (alfaamilase, celulases), produção de vinhos e sucos (pectinases), indústria do leite (lactase, catalase, lipases), indústria farmacêutica (celulases, bromelina, penicilina-acilase, pancreatina), indústria de carnes (papaína), fabricação de queijos (reninas), produção de detergentes (proteases), indústria do pescado (proteases), curtume (pancreatina).

Literatura recomendada

1) ILLANES, A. **Biotecnología de Enzimas.** Ediciones Universitárias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso (1994).

2) PRESCOTT, S.C. & DUNN, C.G. **Industrial Microbiology**. McGraw-Hill, Nova York (1959).

3) REED, G. **Prescott & Dunn's Industrial Microbiology**. The AVI Publishing Company, Westport (1982).

4) REHM, H.J. & REED, G. **Biotechnology** (Coleção de oito volumes publicados a partir de 1981). Verlag Chemie, Weinheim.

BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Esta edição, revista e ampliada, da série Biotecnologia Industrial, é uma contribuição de grande importância teórica e prática para os múltiplos temas abrangidos pelo assunto. É uma obra toda ela elaborada por autores nacionais, coordenados por quatro professores de vasta experiência, representando a condição atual dos estudos e aplicações subordinados ao campo que dá o título à série.

O estudo da Biotecnologia Industrial não deve ser entendido como apenas uma descrição, mais ou menos pormenorizada, de processos biotecnológicos de interesse prático. Em que pesem a necessidade e a importância dessa descrição, não é ela suficiente para formar a almejada estrutura mental do futuro profissional.

Para que o aluno possa, de um lado, compreender o porquê de várias recomendações indispensáveis ao bom andamento das transformações desejadas e, por outro, adquirir uma formação que lhe possibilite enfrentar, racionalmente, questões que poderão se apresentar em sua futura atividade profissional, deve ele possuir um adequado conhecimento de FUNDAMENTOS indispensáveis. Tal é o objetivo primordial deste primeiro volume.

Nove profissionais, pertencentes aos quadros docentes da Universidade de São Paulo e do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, reuniram, neste volume, tópicos fundamentais de microbiologia, genética, engenharia genética, enzimologia, caminhos metabólicos, cinética e termodinâmica de reações enzimáticas, além de, sucintamente, apresentar as etapas que constituem um processo biotecnológico industrial genérico e apontar alguns exemplos com o único objetivo de dar, ao aluno, uma idéia do campo de atuação da biotecnologia industrial.

EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA

ISBN 978-85-212-0784-1